Multiplex szérum-citokinszint vizsgálatok jelentősége különböző kórképekben

Doktori értekezés

Dr. Bekő Gabriella

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Dr. Blázovics Anna igazgató, egyetemi docens
Prof. Dr. Szalay Ferenc egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szőllősiné Dr. Varga Ilona egyetemi docens
Dr. Vannay Ádám Ph.D. MTA tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Szabó Antal egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lugasi Andrea Ph.D. főigazgató
Dr. Kenesei Éva Ph.D. tudományos főmunkatárs

Budapest
2009

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék 2
Rövidítésjegyzék 4
1 Előszó 6
2 Bevezetés 8
2.1 A citokinek 8
2.2 Citokinszint-mérési módszerek 17
3 Célkitűzések 21
4 Betegek, módszerek és anyagok 24
4.1 Mérőmódszereket összehasonlító vizsgálatokban résztvevők 24
4.2 Klinikai vizsgálatokban résztvevő személyek 24
4.2.1 Perinatális vizsgálatok 24
4.2.1.1 Aszfixiás újszülöttek 24
4.2.1.2 Kissúlyú koraszülöttek 25
4.2.1.3 Perinatális szepszisben szenvedő koraszülöttek 26
4.2.2 Citokinek májbetegségekben. 26
4.2.2.1 Vörösbort fogyasztó önkéntesek 26
4.2.2.2 Krónikus májbetegségben szenvedők 27
4.2.2.3 Wilson-kóros betegek 27
4.2.3 Citokinek egyéb belgyógyászati kórképekben 28
4.2.3.1 Prosztatakarcinóma és citokinprofil 28
4.2.3.2 Vesetranszplantációt követő állapot 28
4.3 Módszerek 31
4.3.1 Citokinszint-mérési eljárások 31
4.3.1.1 Citokinszintek mérése Bioplex rendszerrel 31
4.3.1.2 Citokinszintek mérése Biochip rendszerrel 33
4.3.1.3 Egyedi citokinszint-mérések 35
4.3.1.3.1 IL-6-szint mérése Roche Modular E170 analizátorral 35
4.3.1.3.2 IL-6-szint mérése R&D ELISA módszerrel 36
4.3.1.3.3 TNFα-szint mérése R&D Elisa módszerrel 37
4.3.2 Egyéb vizsgálatok 37
4.3.2.1 Fémion-meghatározások 37
4.3.2.2 Antioxidáns aktivitás meghatározási módszerek 38
4.3.2.3 Transzmetilálás vizsgálata 39
4.3.2.4 Zn-protoporfirin és protoporfirin meghatározás 39
4.4 A vizsgálatokhoz felhasznált vegyszerek és kitek 40
4.5 Statisztikai elemzés 40
5 Eredmények 41
5.1 Összehasonlító vizsgálatok 41
5.2 Klinikai vizsgálatok 44
5.2.1 Citokinszintek perinatális jelentősége 44
5.2.1.1 Aszfixia, teljes testhűtés és citokinkinetika 44
5.2.1.2 Endogén kortizol hatása a szisztémás citokinszintekre koraszülött és újszülöttkorban 50
5.2.1.3 Perinatális szepszis és citokinprofil 59
5.2.2 Citokinek májbetegségekben. A fémion-koncentrációk összefüggése a szisztémás citokinszintekkel 62

5.2.2.1 A vörösborfogyasztás hatása a citokinszintekre 62
5.2.2.2 Citokinprofil és májcirrhosis.....67
5.2.2.3 Wilson-kór és citokinek.....68
5.2.3 Citokinek egyéb belgyógyászati kórképekben 72
5.2.3.1 Vesetranszplantáció, malnutríció és gyulladás 75
6 Megbeszélés.....82
6.1 Összehasonlító vizsgálatok.....82
6.2 Citokin-profil vizsgálata fiziológiás és patológiás körülmények között.....83
6.2.1 Citokinszintek perinatális jelentősége.....83
6.2.2 Citokinek májbetegségekben. A fémion-koncentrációk összefüggése a szisztémás citokinszintekkel.....90
6.2.3 Citokinek egyéb belgyógyászati kórképekben 97
Tézisek 103
Összefoglalás.....104
Summary 105
Irodalomjegyzék 106
A dolgozathoz kapcsolódó közlemények.....123
Disszertációtól független közlemények 127
Köszönetnyilvánítás.....130

Rövidítésjegyzék

ALAT	alanin-aminotranszferáz
ALP	alkalikus foszfatáz
ASAT	aszpartát-aminotranszferáz
APC	antigénprezentáló sejt
BMI	testtömeg-index
BV	baseline value
CD4	a segítő T-sejtek (Th) felszínén kifejeződő koreceptor molekula
CD8	a citotoxikus (Tc) lymphocyták felszínén kifejeződő molekula
CRP	C-reaktív protein
EGF	epidermal growth factor epidermális növekedési faktor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay enzimhez kötött szendvics immunoassay
EV	end value
fPSA	free (szabad) PSA
FVS	fehérvérsejtszám
eGFR	estimated (becsült) glomeruláris filtrációs ráta
GSH-Pox	glutation-peroxidáz
HCV	hepatitis C vírus
HDON	hidrogén-donor aktivitás
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectrometry induktíven csatolt plasma emissziós spektrometria
IFNγ	interferon gamma
IL	interleukin
IL-1α	interleukin-1 alfa
IL-1β	interleukin-1 béta
IL-2	interleukin-2
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6

IL-8	interleukin-8
IL-10	interleukin-10
IL-12	interleukin-12
IQR	interkvartilis tartomány
LAK-sejt	Limfokin Aktivált Killer-sejt
LPS	lipopoliszacharid – baktériumok falából nyerhető endotoxin
MCC	major komorbid állapot
MCP	monocita kationos protein
MHC	major hisztokompatibilitási komplex
MICS	malnutríció-gyulladásos komplex szindróma
MIS	Malnutrition Inflammation Score malnutríció-gyulladásos pontérték
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
NK- sejt	Natural Killer-sejt „természetes ölő” sejt
OLD	over the level of detection
PBC	primer biliáris cirrhosis
PCT	procalcitonin
PSA	prosztata specifikus antigén
REV	relatív hatás értékek
RFU	relatív fluoreszcens egység
RLU	relative light unit
SEM	Structural Equation Model strukturális egyeneletek modellezese
SOD	szuperoxid-dizmutáz
Th	T helper
TNFα	tumor nekrózis faktor alfa
TSC	totál scavanger kapacitás
VEGF	Vascular endothelial growth factor vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

A dolgozatban található egyéb rövidítéseket a jobb érthetőség kedvéért a szövegkörnyezetben megmagyaráztam.

A dolgozat megírásánál a IUPAC nómenklatúrát alkalmaztam. Az orvosi kifejezéseket az orvosi helyesírási szótár szabályai szerint írtam.

1 Előszó

A Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumának vezetőjeként számos olyan kérdéssel, megoldandó problémával találkozom, melynek kapcsán a rendszerszintű megközelítés segít, azaz, amikor a klinikus részéről feltett kérdésre a klinikai adatok, laboratóriumi vizsgálatok és egyéb diagnosztikus eljárások tükrében összességében kell választ adni. Tapasztalataim szerint különösen akkor van ennek a szemléletnek nagy jelentősége, amikor valamilyen immunmediált (kór)folyamat megítéléséről, a terápia hatásáról, esetleg a progresszióról kell nyilatkozni. Az immunrendszert érintő zavarokban ugyanis egyszerre számos komponens – fehérvérsejtek, citokinek, akut fázis fehérjék – vesz részt, melyek egymás hatásait erősítik, vagy éppen gyengítik.

A méréstechnika körülményessége, a mintaigény és nem utolsósorban a vizsgálatok ára miatt eddig egy-egy betegségben csak néhány kiragadott citokin vagy más gyulladásos analit szintjét tudtuk monitorozni, ezek komplexitását nem lehetett leírni. Ezért tartom az utóbbi évek egyik legnagyobb technikai vívmányának, hogy egyazon mintából egyidejűleg számos gyulladásos válaszban szerepet játszó faktor szintje vizsgálható és meghatározható. A ma már Magyarországon is rendelkezésre álló és elérhető mérési rendszerek segítségével minden korábbinál pontosabb képet kaphatunk az egyes kórfolyamatokban a gyulladásos válasz milyenségéről.

Ph.D. munkám célja egyrészt az volt, hogy különböző módszerekkel kapott citokinszinteket összehasonlítsam, másrészt, hogy különböző klinikai állapotokban vizsgáljam a citokinszintek kinetikáját, az egészséges referenciacsoporttól való eltérését. Mivel a szisztémás gyulladás intenzitását és a citokinszinteket a szervezetben zajló szabadgyökös reakciók, illetve a szabadgyökös reakciók intenzitását meghatározó fémion-szintek alapvetően befolyásolják, vizsgálataim egy részében kapcsolatot kerestem a citokinszintek, a szervezet antioxidáns védelme és a szérum / szöveti fémionok koncentrációi között is.

Kutatómunkám kapcsán a citokinszinteket különböző perinatális kórfolyamatokban (perinatális aszfixia, veleszületett szepszis, koraszülöttség); májbetegségekben (alkoholos májkárosodás, Wilson-kór, különböző cirrhosis-típusok), prosztatakarcinómában és vesetranszplantációt követően mértem. Számos esetben munkatársaimmal együtt szembesültem azzal, hogy a jelenleg széles körben alkalmazott statisztikai eljárások nem alkalmasak a citokinszintek összefoglaló módon való

jellemzésére, kinetikájuk leírására, ezért erőfeszítéseket tettünk új, a citokinszintek komplex értelmezését lehetővé tevő statisztikai modellek kidolgozására.

Vizsgálati módszereink – multiplex citokinszint-mérés, fémion-profil meghatározás, szabadgyökös reakciók vizsgálata – részletekben csak néhány kiemelt magyar laboratóriumban érhetők el. Ennyire összetett rendszerként pedig nemcsak Magyarországon, de világszerte sem alkalmazták még ezeket klinikai kérdések megválaszolására. Az általunk használt technikák a rutinlaboratóriumi diagnosztika számára komplexitásukban jelenleg nem elérhetőek, illetve nagy valószínűséggel a közeljövőben sem kerülnek bevezetésre, mivel igen költségigényes meghatározásokról van szó. Ezért sok klinikai adatra van szükség a diagnosztikus relevancia meghatározásához. Meggyőződésem, hogy az adott technikai színvonal mellett a klinikai adatgyűjtés az a pont, ami meghatározza, hogy később milyen irányba érdemes a klinikai laboratóriumi vizsgálatokat fejleszteni.

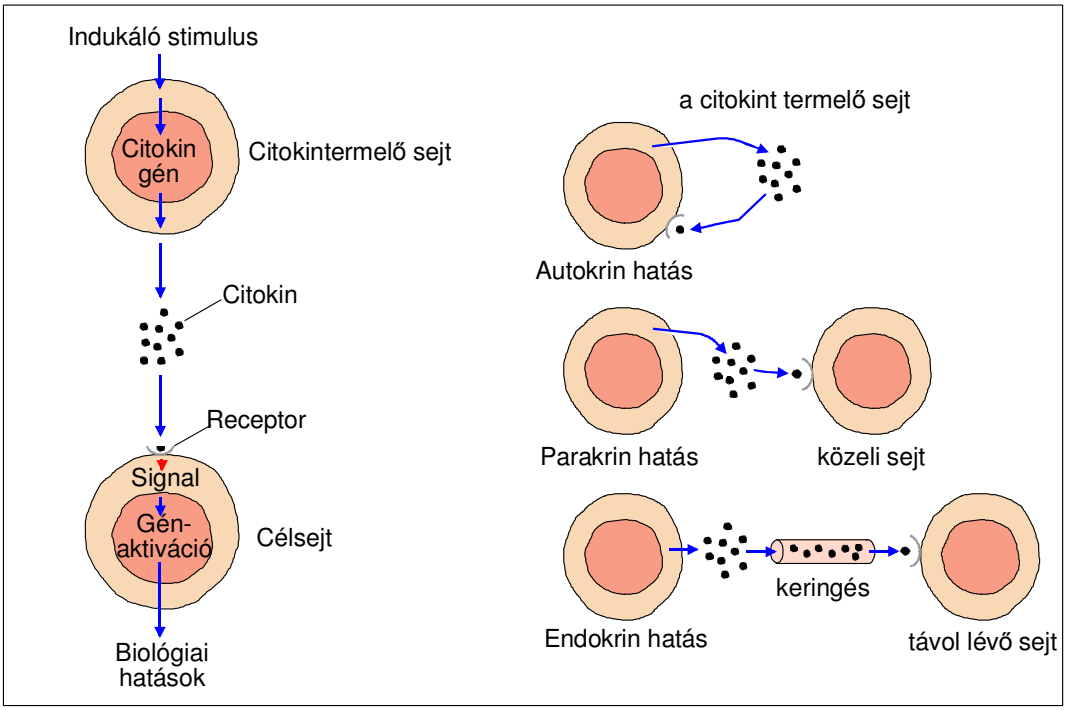
Bízom benne, hogy Ph.D. kutatómunkám során elért eredmények és a megszerzett tapasztalat ezt a munkát is segíteni fogja.

2 Bevezetés

2.1 A citokinek

Az immunrendszer sejtjei között a kommunikáció citokineken, kis, 8 -40 kDa nagyságú fehérjemolekulákon keresztül valósul meg. A legtöbb citokint egészséges körülmények között nem termelik a sejtek, csak speciális hatásokra, melyek gyakorlatilag azonosak a „sejt stresszorokkal" (például UV fény, hőhatás, hiperozmolalitás, vagy az idegen felszín). A szintézis után a citokinek azonnal kiválasztódnak a sejtből, ezáltal biztosítva a gyors hatás kialakulását [*Cavaillo* 2001].

A citokinek fokozzák vagy gátolják az immunkompetens sejtek aktiválását, proliferációját és differenciálódását, ezáltal szabályozzák az immunfolyamatokat, az immunválasz intenzitását, tartamát, az ellenanyagok szintézisét és további citokinek termelését. Valamennyi immunsejt képes citokinek termelésére, illetve rendelkezik citokin receptorokkal. Immunmoduláló hatásuk autokrin, parakrin, pleiotróp és ritkán endokrin. Autokrin hatásuk révén maga a termelő sejt a célpont. Parakrin módon közvetlen környezetükben található sejteket késztetik citokin termelésre. Az endokrin hatás pedig távoli sejtcsoportok aktiválását is eredményezheti. Pleiotróp sajátságuk következtében egyszerre sokféle hatást válthatnak ki a különböző targetsejteken. Ugyanakkor redundásak is, mert többféle citokin képes azonos választ kiváltani. Ismert a citokinek közötti szinergista és antagonista kölcsönhatás is. (1. ábra).



1. ábra: A kiváltó stimulus hatására termelődő citokin (a) autokrin, parakrin és endokrin hatásokkal (b) rendelkezik *(Berki Tímea Immunológiai Továbbképző 2008)*

A citokineket biológiai tulajdonságaik alapján osztályozzák, mivel nincs olyan aminosav-szekvencia vagy térbeli struktúra, mely mindegyikre egyaránt jellemző lenne. A csoportosításra az egyik lehetőség a gyulladásra gyakorolt hatásuk. Bizonyos citokinek egyértelműen fokozzák a gyulladást, ezeket proinflammatorikus citokineknek [*Dinarello* 2000] nevezik, míg más citokinek ellensúlyozzák a proinflammatorikus citokinek aktivitását, ezek az antiinflammatorikus citokinek [*Opal és DePalo* 2000]. A kettő közötti határ sokszor nem egyértelmű [*Cavaillo* 2001].

Döntően proinflammatorikus hatású citokinek

Interleukin-1

Az IL-1 családot az IL-1α, IL-1β, és a hatásukat gátló IL-1 receptor antagonista (IL-1ra) alkotja [*Dinarello* 1998]. Az IL-1α-t és az IL-1β-t (a továbbiakban: IL-1) a mononukleáris sejtek termelik gyulladásos folyamatokban és baktériumok hatására. Mindkét citokin 31000 Da molekulatömegű prekurzor molekulákból képződik; a hatékony fehérjék molekulasúlya 17000 Da [*Edelson és mtsai* 1999].

A legtöbb IL-1α molekula a sejt citoszoljában marad, ahol valószínűleg az IL-1 termelődés autokrin szabályozásában van szerepe. A prekurzor a sejt felszínéhez kerül és ott a membránnal asszociálódik. A membránkötött prekurzor biológiailag aktív, a szomszédos sejtek parakrin szabályozásában játszhat szerepet.

Az ILα-val szemben nagy mennyiségű IL-1β szecernálódik az extracelluláris térbe és kerül a keringésbe. Az IL-1β prekurzorát az intracellulárisan elhelyezkedő interleukin-1β konvertáló enzim (ICE) alakítja aktív fehérjévé [*Tocci* 1997].

Az IL-1alfát és bétát (továbbiakban IL-1) kétféle sejtfelszíni receptor köti. A 80 kDa méretű, I. típusú receptor a legtöbb sejten megtalálható, az IL-1 hatásának transzdukciójában tölt be fontos szerepet. A 68 kDa-os, II. típusú receptor elsősorban neutrofil granulociták, monociták, csontvelői sejtek és B-limfociták felszínén található. Leírtak emellett egy, a receptor működéséhez szükséges fehérjét, az IL-1 receptor akcesszor fehérjét is (IL-1R-AcP) [*Dayer* 2002]. A receptorok és az akcesszor fehérje extracelluláris részei az immunglobulin-családba tartoznak, három IgG szerű doménből állnak, az IL-1 kötő helyeik hasonlóak.

Az IL-1 stimulálja a T- és a B-limfocitákat. Az IL-1 a TNFα-val szinergista módon hatva fokozza a foszfolipáz A_2, az iNOS aktivitását, az endoteliális adhéziós molekulák expresszióját és a kemokin szintézisét. Ennek eredménye vazoaktív és gyulladásos mediátorok termelődése. [*Dunn* 2001]

Interleukin-2

Az IL-2 egy 14 – 17 kD méretű glikoprotein, térszerkezeteként négy alfa-hélixet tartalmazó globuláris fehérje [*Abbas* .2003]

Az IL-2 a T-sejt mediálta immunválasz indukciójához és regulációjához szükséges citokin. Az IL-2-t antigén-aktivált T sejtek – elsősorban CD4+, kisebb arányban CD8+ sejtek – termelik. Autokrin módon fokozza a T-sejt proliferációt és potencírozza az antigén-aktivált T sejtek apoptózisát. Ezen túl egyéb immunsejtek proliferációját és differenciációját is elősegíti. Az NK- sejtek növekedését serkenti, fokozza citolitikus hatásukat. A B-sejtek esetében növekedési faktorként hat, illetve az antitest-szintézist stimulálja. Az IL-2 központi szerepet játszik az antigén-aktivált CD4+ sejtek apoptózisában akkor, ha az immunválasz perzisztál és a T sejtek egyre nagyobb IL-2 szinteknek vannak kitéve. [*Thornton* 1998]

Interleukin-6

Az IL-6-ot monociták, makrofágok és endotélsejtek termelik. Sokáig proinflammatorikus citokinnek tekintették, mely LPS hatására a TNFα-val és az IL-1-gyel együtt aktiválódik [*Luheshi* 1998].

Az IL-6 hatásait az egyetlen transzmembrán fehérjéből álló IL-6 receptoron keresztül fejti ki. A citokin hatására a receptor egy másik transzmembrán receptort, a gp 130-at homodimerizálja és ez indítja el a szignál-transzdukciót. Az IL-6 receptor T-sejteken, aktivált B-sejteken, valamint perifériás monocitákon és makrofágokon található meg. Az IL-6-nak van szolubilis formája is, mely a membránreceptor extracelluláris doménjéből áll. A citokin a gp 130-at még a szolubilis receptoron át is képes aktiválni, még akkor is, ha a sejtek felszínén nincs is transzmembrán receptor [*Lorenz,* 2002].

Az IL-6 csökkenti a TNFα és az IL-1 termelődését. Ugyancsak csökkenti egyéb, proinflammatorikus hatású fehérjék (GM-CSF, IFNγ) szintézisét, viszont nem befolyásolja más antiinflammatorikus citokinek, mint az IL-10 és a transforming growth factor-β (TGF- β) termelődését [*Romagnoli,* 2001]. Az IL-6 fokozza az antiinflammatorikus IL-1ra és a solubilis TNFα receptorok elválasztását. A citokin limfoid és nem-limfoid sejtekben is képződik és befolyásolja T és B-sejtek differenciálódását és proliferációját. Emellett az IL-6-nak igen sokrétűek a hatásai, részt vesz az endokrin és a metabolikus folyamatok szabályozásában is.

Az IL-6-nak pro- és antiinflammatorikus tulajdonsága is van, emiatt besorolása is változó. Az esetek egy részében pro-, másik részében antiinflammatorikus hatású citokinként írják le. Hatásait az IL-6 receptoron keresztül fejti ki, ami T-sejteken, aktivált B-sejteken, valamint perifériás monocitákon és makrofágokon van jelen [*Luheshi,* 1998].

Interleukin-8

A 8 kD méretű IL-8 kemokint a makrofágok és más sejttípusok, így epiteliáls sejtek termelik. [*Utgaard és mtsai* 1998, *Wolff és mtsai* 1998] Hatását G-protein mediált módon, a CXCR1 és CXCR2 receptorokon keresztül fejti ki.

A kemokin kemoattraktáns, illetve hatékony angiogenetikus tulajdonságokkal rendelkezik. Elsődleges hatásaként a célsejtekben, például a neutrofil granulocitákban kemotaxist idéz elő, IL-8 hatására ezek a sejtek aktiválódnak, bioaktív anyagok

szabadulnak fel belőlük, megindul a légzési burst. Fagocitózist indukál, a fagocitált antigén hatására toll-like receptor képződés kezdődik. A neutrofil granulociták mellett számos egyéb sejt is reagál az IL-8 hatásaira, így az endotél sejtek, makrofágok, hízósejtek, keratinociták. [*Kőhidai* 1998]

Interleukin-12

Az IL-12 teremti meg a kapcsolatot a veleszületett és az adaptív immunitás között. A veleszületett immunitás alapvető mediátora, aktiválja a sejt közvetített szerzett immunitást. Az IL-12-t az antigénprezentáló sejtek (APC), azaz a makrofágok és dendritikus sejtek termelik, bakteriális endotoxin (LPS), intracelluláris kórokozók, és antigénnel stimulált T sejtek hatására. Az IL-12 egyedi szerkezetű citokin, 70 kD tömegű heterodimerek alkotják, melyek egy 35kD és egy 40 kD tömegű alegységből épülnek fel. A p35 alegység 4 α-helikális szerkezettel jellemzett citokinekkel homológ. A 40 kDa-os lánc az IL-6 receptorral mutat szerkezeti rokonságot. Ennek alapján az aktív dimer egy szolubilis citokinreceptor komplexnek is tekinthető. A p40 alegység I-es típusú citokinreceptor szerű, de Ig-like domént is tartalmaz, csak az APC sejtek képesek szintetizálni, így csak ezekben alakul ki aktív IL-12 heterodimer. Hatását I-es típusú wsxws szekvenciát tartalmazó citokinreceptoron keresztül fejti ki [*Bokodi,* 2007].

Az IL-12 fokozza az NK és T sejtek IFNγ termelését, ami makrofág aktivációhoz vezet. Hatására a CD4 pozitív T sejtek Th_1 sejtekké differenciálódnak, (T sejt növekedési faktor). A Th_1 sejtek az adaptív immunitás fagocitáit aktiválják. Az NK sejtek IL-12 hatására limfokin aktivált ölő (LAK) sejtekké alakulnak, aktiválódnak a CD8 pozitív citotoxikus limfociták is. [*Kathy,* 2000]

Tumor nekrózis faktor-α

A TNFα prekurzora egy 230 aminosavból álló 25 kDa-os molekula, ami a TNF-α-t termelő sejtek membránjában helyezkedik el. Bár ennek is lehet biológiai hatása, mivel befolyásolja a sejtek közötti kapcsolatot, az aktív forma proteolízis során keletkezik. Az így létrejövő, 157 aminosavból álló 17 k Da-os monomerek hármasával összekapcsolódva alkotják az aktív trimer TNF-α molekulákat

A TNF-α-t döntően a makrofágok termelik, elsősorban endotoxin-stimuláció, vagy migrációgátló faktor hatására. Az IFNγ a TNFα termelés egyik fontos, szinergista hatású stimulánsa, az IL-10 viszont csökkenti a TNFα szintézist.

A citokin termelésében részt vesznek az aktivált T-sejtek, hízósejtek, természetes ölő sejtek (natural killer-sejtek), Kupffer-sejtek, asztrociták, gliasejtek, oszteoblasztok. A TNF-α termelés egyik legkifejezettebb stimulusát az endotoxint vagy lipopoliszacharidot termelő Gram-negatív baktériumok jelentik [*Treszl és mtsai* 2000]. A Gram-pozitív baktériumok, vírusok és paraziták a makrofág sejtek serkentése révén indukálnak fokozott TNF-α szintézist.

A TNF-α vérszintje egészséges emberben a jelenlegi metodikákkal a kimutathatósági küszöböt nem éri el. Aktiváció, pl. gyulladás hatására a TNF-α-mRNS szintje 15-30 percen belül kezd emelkedni, de ezt proteinszintézis egyelőre nem kíséri. Az mRNS-ről átíródó, a membránba kihelyeződő 25 kDa-os prekurzor molekula hasítását egy metalloproteáz enzim, a TNF-α konvertáló enzim végzi. Az enzim aktivitását, ezáltal az aktív forma képződését lipopoliszacharidok és citokinek, többek között maga a TNF-α is befolyásolja. [*Black* 1997]. A TNF-α hatásait specifikus receptorcsalád közvetíti. A TNF-α két receptorhoz, az 55 kDa-os és a 75 kDa-os receptorhoz egyforma affinitással kapcsolódik. Közös jellemzőjük, hogy két egyforma transzmembrán doménből állnak, melyekben a receptorcsaládra jellemző módon ciszteinben gazdag extracelluláris láncszakaszok vannak. Ezek az aminosav-szekvenciák általában 3-6-szor ismétlődnek. Egyes receptorokban egy 60 aminosavból álló citoplazmatikus szekvencia is jelen van, ami felelős az apoptotikus szignál közvetítéséért. Ezen receptorok a szervezet szinte valamennyi testi szomatikus sejtjén megtalálhatók. A 75 kDa-os típus nagyobb mennyiségben van jelen az endotél- és hemopoetikus sejteken. A receptorok apoptotikus, illetve proliferatív szignált közvetítenek. [*Wajant]* 2003] Kis koncentrációban a TNFα aktiválja a gyulladásos reakciókat. Elősegíti az érendotél sejteken az adhéziós molekulák expresszálódását, fokozza a neutrophil és eozinofil sejtek, makrofágok bactericid hatását. Részt vesz a specifikus immunválasz koordinálásában is: hatására fokozódik a B-limfociták immunglobulin- és a fibroblasztok kolóniastimuláló faktor termelése. Akutan, nagy koncentrációban a TNFα pirogén. Aktiválja az alvadási rendszert és ennek révén szövetkárosodást vált ki. [*Old* 1995]

Interferon-gamma

Az IFNγ (II típusú interferon) a legfontosabb makrofág aktiváló citokin [*Schroder*, 2004]. Az IL-12-vel stimulált NK és T sejtek termelik. Homodimer

formában fordul elő. Hatását II-es típusú citokinreceptoron keresztül STAT1 kinázon keresztül fejti ki. Az aktivált makrofágok kórokozó eliminálló képességét fokozza azáltal, hogy fokozódik a szöveti faktor, a fagocita-oxidáz, az iNOS, a növekedési faktorok, a citokinek (pl. IL-12) és a mikrobicid enzimek szintézise és expressziója. Ugyancsak fokozódik az MHC I és II expressziója az APC sejteken. Az IFNγ az adaptív immunitást Th_1 irányba tolja, fokozza a Th_1 és gátolja a Th_2 sejtek képződését. Az IFNγ hatással van a B-sejtek immunglobulin termelésére is, gátolja az IL-4 függő immunglobulinok képződését. Az IFNγ a neutrofil és NK sejteket is aktiválja [*Bokodi* 2007, *Schroder* 2004] .

Döntően antiinflammatorikus hatású citokinek

Interleukin-4 (IL-4)

Az IL-4 20 kDa-os glikoprotein. Pleiotrop hatású citokin, mely befolyásolja a T helper (Th) sejtek differenciálódását. Érett Th_2 sejtek, valamint a hízósejtek és a bazofil sejtek termelik [*Delespesse és mtsai* 1997]. Hatására a Th prekurzor sejtek Th_2 irányba differenciálódnak [*Haas és mtsai* 1999]. A Th_2 sejtek ugyancsak termelnek IL-4-et, mely így a citokin autokrin termelődése révén tovább erősíti a sejtproliferációt. A Th_2 sejtek termelte IL-4 és IL-10 a makrofág eredetű IL-12 termelés csökkentése révén a Th1 válasz szuppressziójához vezet.

Az IL-4 részt vesz a Th_2 válasz irányításában is, gátolja a gyulladásos citokinek expresszióját és elválasztását. A monocita eredetű citokinek (például az IL-1, TNFα, IL-6) hatását blokkolja. Emellett gátolja a makrofágok citotoxikus tevékenységét és nitrogénmonoxid termelését. Fokozza viszont az antiinflammatorikus IL-1receptor alfa termelődését.

Az IL-4 több strukturális sejt működését is befolyásolja. Bakteriális fertőzés esetén hatása a kórokozó típusától függ; úgy tűnik, Gram-negatív fertőzésben fokozza, Gram-pozitív baktériumok okozta fertőzésben csökkenti a védekezőképességet. Az IL-4 hatását az IL-4 receptor közvetíti [*Nelms és mtsai* 1998, *Nelms és mtsai* 1999].

Az IL-4 gátolja a gyulladásos citokinek expresszióját és elválasztását. A monocita eredetű citokinek (például a IL-1, TNF-α, IL-6) hatását blokkolja. Emellett gátolja a makrofágok citotoxikus tevékenységét és nitrogénmonoxid termelését. Fokozza viszont az IL-1ra termelődését. Az IL-4 az allergiás gyulladás egyik kulcs-citokine. Az IL-4 indukálta IgE-függő hízósejt-aktiváció kiemelkedő szerepet játszik az

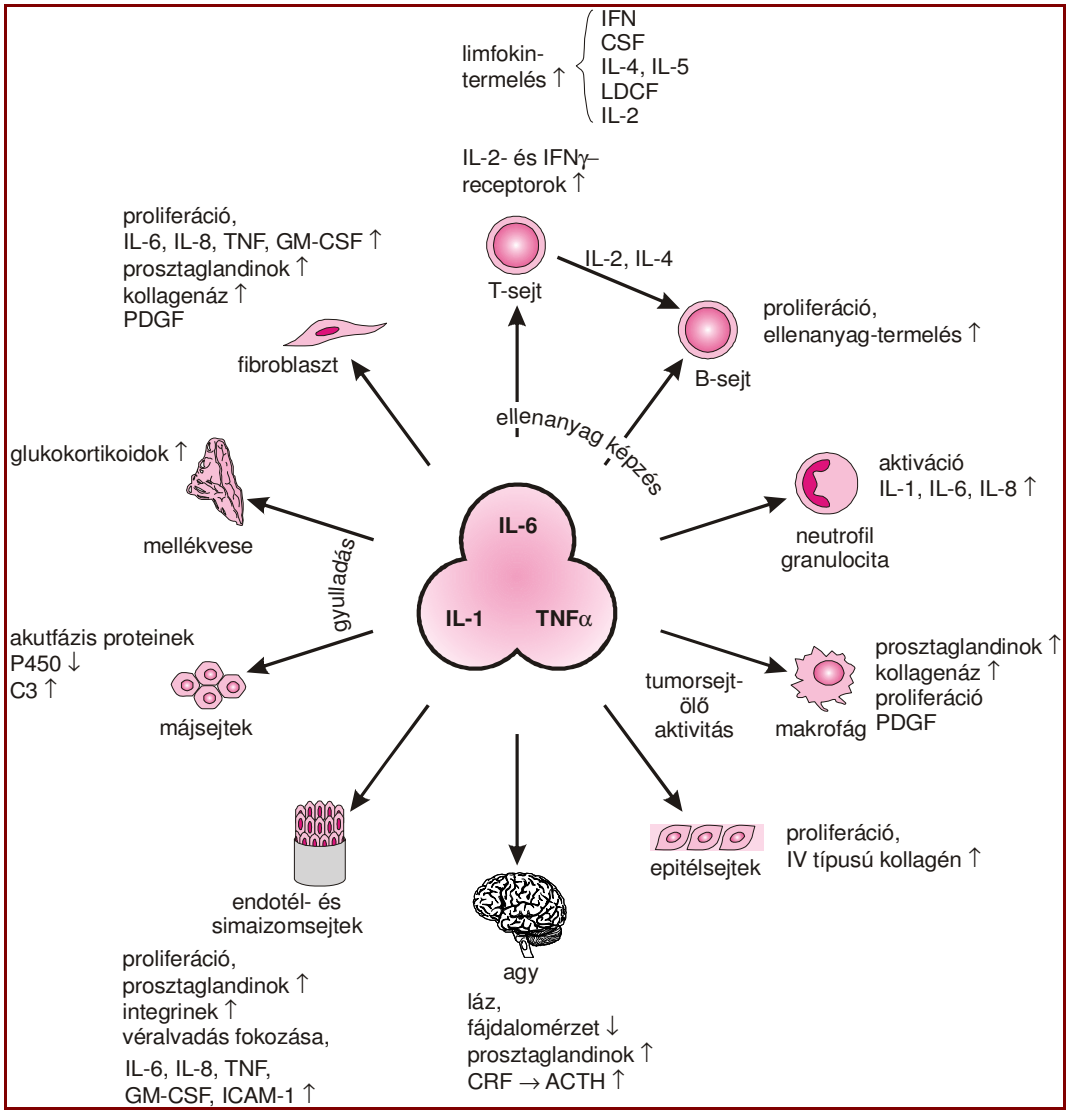
azonnali allergiás reakciók mediálásában. Az IL-4 emellett a mucin-gén expressziójának fokozásával hajlamosít a légúti obstrukció kialakulására. IL-4 hatására fokozódik a VCAM-1 molekulák expressziója a vaszkuláris endotél sejteken, ami meghatározza a T-limfociták, monociták, bazofilek és eozinofilek migrációjának irányát. Emellett az IL-4 gátolja az eozinofil sejtek apoptózisát és az eotaxin fokozott expressziója révén fokozza az eozinofil-sejtek túlsúlyával járó gyulladást [*Dabbagh és mtsai* 1999, *Wang és mtsai* 2001, *Wedi és mtsai* 1998].

Interleukin-10

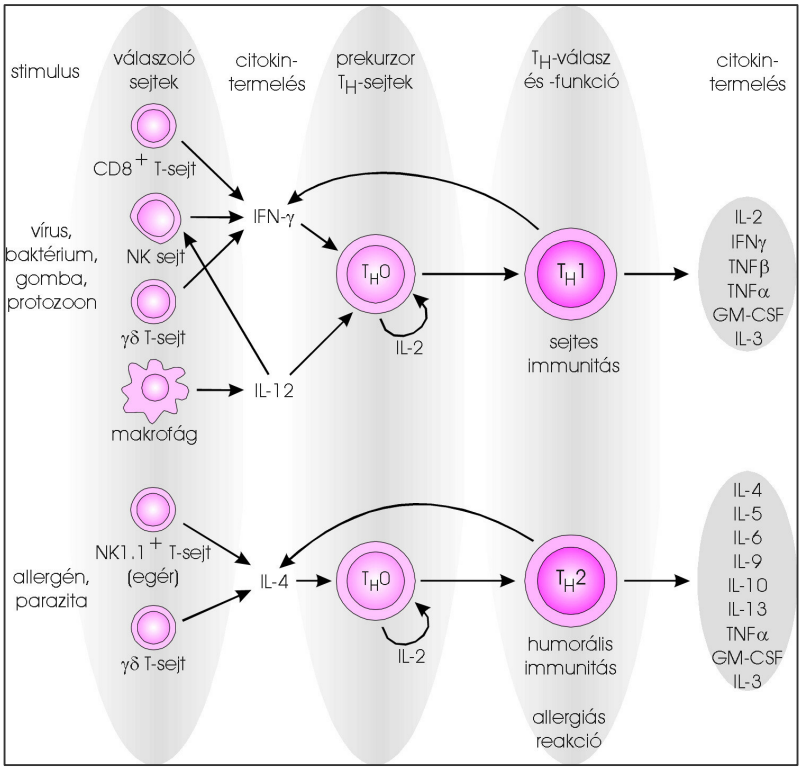
Az IL-10-et a CD4+ és CD8+ T-sejtek, B-sejtek, makrofágok, aktivált hízósejtek és keratinociták termelik. Az IL-10 a humán immunválasz legfontosabb anti-inflammatórikus hatású citokinje; gátolja a Th1 eredetű gyulladásos fehérjék szintézisét [*Mocellin és mtsai* 2003]. Gátolja emellett a monocita/makrofág eredetű proinflammatórikus proteinek termelődését. A makrofágokra kifejtett hatékony immunszuppresszív hatásával ellentétben az IL-10 stimulálja a B-sejtek proliferációját, differenciálódását és antitesttermelését [*Conti és mtsai* 2003].

Az IL-10 két, 160 aminosavból álló, szorosan összekapcsolódó 18 kDa-os homodimer formájában van jelen a keringésben. A citokin receptora egy 110 kDa-os sejtfelszíni molekula, mely közvetíti a TNF-α, IL-1, IL-6, GM-CSF termelődését gátló hatást. Csökkenti emellett a TNF-α receptorok sejtfelszíni expresszióját.

Szisztémás fertőzésekben az IL-10 szintje a plazmában is mérhetővé válik és jelentősen befolyásolja az immunválaszt. Megfigyelték például, hogy magas IL-10 és kis TNF-α szérumszintű betegek kisebb valószínűséggel halnak meg meningococcus-okozta fertőzésekben. Állatkísérletben az IL-10 adására javult az endotoxémia túlélése. [*Moore és mtsai* 2001] Az egyes citokinek szövetekre gyakorolt hatásukat nem önmagukban, hanem komplex citokin- és endokrinkörnyezet részeként fejtik ki (lásd 2.1.B ábra) [*Abbas* 2003]. Az egyes stimulusokra bekövetkező pro- és antiinflammatorikus citokintermelés, a termelődő citokinek aránya meghatározza a kialakuló immunválasz jellegét (Th1 és Th2 típusú; lásd 3. ábra)



2. ábra: A főbb proinflammatorikus citokinek szerepe az akut fázis reakcióban és annak szövetspecifikus hatásaiban *(Gergely J, Erdei A. Immunbiológia 1998: 32. oldal)*



3. ábra: A kiváltó ágens hatására reagáló sejtek citokineket termelnek, melyek meghatározzák az immunreakció jellegét *(Gergely J, Erdei A. Immunbiológia 1998:201. oldal)*

2.2 Citokinszint-mérési módszerek

A citokinek élettani folyamatokban és betegségekben játszott szerepére vonatkozóan több mint két évtizede gyűlnek az adatok. Ezek azonban sokszor nem egyértelműek, vagy ellentmondásosak, amiben a metodikai problémák kulcsszerepet játszanak.

A citokinszintek és növekedési faktorok meghatározását több tényező nehezíti. A legfontosabbak:

(1) Az ugyanolyan néven, jellel jelzett citokin a szervezetben monomer és polimer formában is jelen lehet; többféle alegységből áll, melynél az egyes alegységeket külön sejttípusok termelik; illetve kémiailag sem mindig jól karakterizáltak. Mind a citokin mind a növekedési faktorok meghatározásánál, mivel fehérjékről van szó, amelyek esetleg több epitóppal rendelkeznek, a szintek mérése során alkalmazott immunanalitikai módszerek szenzitivitását és specificitását, de a referencia

tartományt is alapvetően meghatározza a gyártás technológiája, a vegyszer sorozatszáma. [*Bekő és mtsai* 2008]

2) Nyugalmi állapotban a citokinszintek a plazmában igen alacsony (pmol/l) koncentrációban vannak jelen, azaz jelentős hányaduk nem is detektálható.

(3) Stimulus hatására a citokinszint többszörösére emelkedik, de ez a változás átmeneti, citokinenként különböző kinetikát mutat.

(4) Mivel a citokinek hatásukat egy komplex rendszer részeként fejtik ki, sok esetben az 1-1 citokin klinikai jelentőségére korlátozódó mérések eredménye nem informatív.

A fenti problémák figyelembevétele mellett az alábbi mérési technikák terjedtek el.

ELISA módszer

A citokinek klasszikus ELISA-val való kimutatásakor a kettős szendvics módszert alkalmazzák, melynek fajlagossága igen nagy. Ezzel a módszerrel a citokinek mennyisége a biológiai aktivitásuktól függetlenül mérhető, ezért – főként a rövid életidejű fehérjék esetében – az eredmény nem mindig jelzi a tényleges biológiai aktivitást. A mérést az is befolyásolhatja, hogy a különböző citokinek oldott formájú receptorokhoz vagy inhibitorokhoz kötött formában is előfordulhatnak.

Biochip és bioplex módszerek

A citokin funkciók komplexek, így egy citokin profil nagyon értékes információt jelenthet egy adott immunválaszban. Nagy előrelépést jelentett a citokin biochip panelek és a mikrogyöngyökhöz kötött citokin antitestek, a BioPlex panelek megjelenése, amikor egyszerre tudunk 12 vagy akár 27 citokint, növekedési faktort vizsgálni.

Biochip technika citokinek, kemokinek és növekedési faktorok kimutatására

Ez a protein array a nagyon kis koncentráció (pg/ml), és a zavaró tényezők kizárása végett háromféle immunoassay-t alkalmaz egyszerre:

1. kompetitív immunoassay (enzimmel jelölt analitot használ)
2. sandwich immunoassay (enzimmel jelölt antitestet használ)
3. antibody capture immunoassay

Randox **Biochip módszert** (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, United Kingdom) használva a kemilumineszcens jeleket egyszerre méri egy készülék egy hűtött

CCD (charge couple device) kamerával és standard kalibrációs görbékhez hasonlítva kiértékeli egy speciális programmal a teljes arrayn. Egy chip mérete, melyre a beteg 100 µl mintáját pipettázzuk, mindössze 9mmx9 mm. Ezzel a módszerrel 3-4 óra alatt 42 beteg 12 pro- és antiinflammatorikus citokinjét és növekedési faktorát (háromszintű kontrollálást használva) tudjuk lemérni. A Randox teljes automata (EVIDENCE) készülékkel is rendelkezik a biocipek méréséhez. Ebben a rendszerben egy chip felületére maximum 23 analit (antitest) köthető. A citokinek mellett számos panelt fejlesztettek ki. [*Stephen és mtsai* 2005]

Bio-Plex technika citokinek, kemokinek és növekedési faktorok kimutatására

A Bio-Plex technika az **xMAP (x**(number) **M**ulti – **A**nalyte **P**rofiling/Multiplexing) technológián alapul, melyet a Luminex (Luminex Corporation; Austin, USA) multiplex assay-vé fejlesztett az elmúlt néhány évben. A megoldás a chiptechnikán (szendvics és kompetitív immunoassayt használva) és a flowcytometrián alapul.

Mikrogyöngyöket (5 µm átmérőjű, polisztirén) vörös és infravörös festékkel színezik. A két festék aránya 100-féle gyöngytípust eredményez, így egy plexen egyszerre elméletileg 100 féle vizsgálat is mérhető. A gyöngyökhöz különböző monoklonális antitesteket kötnek, melyek összekeverhetők és a microplate lyukaiból a chiphez hasonlóan egyszerre mérhetők. A szendvics ELISA utolsó lépéseként fluoreszcens jelölést használnak. A készülék kapillárisán áthaladó valamennyi gyöngyöt 2 színű lézer világítja meg. A piros fény a gyöngy típusát érzékeli, a zöld pedig a fluoreszcens jel intenzitását méri. A speciális software összerendezi a jeleket, és a standard görbékhez hasonlítva kiírja a plexben mért citokinek értékeit. [*Desplat-Jego és mtsai* 2007] A módszer szenzitivitása és érzékenysége az ELISA tesztekhez hasonló. A dinamikus range citokineknél lényegesen szélesebb (1,95-32 000 pg/ml) mint az ELISA és a Biochip mérések esetén.

A módszer előnyei közül ki kell emelni a flexibilitást. Citokinek esetén ez azt jelenti, hogy egy plexen tetszőleges válogatásban és számban (akár 27-féle) citokin, kemokin, növekedési faktor mérhető (biochip módszernél mindig ugyanazt a 12-félét mérjük). A minta a szérumon, plazmán és szöveti felülúszón kívül, bármely testnedv vagy szöveti homogenizátum lehet. A szükséges mintamennyiség 50 µl. A vizsgálatok

költsége harmada az ELISA módszerrel mért tesztekének, ráadásul minél több tesztet mérünk egy plexben, a fajlagos költség annál kisebb. [*Bekő és mtsai* 2008]

A flexibilis multiplexek nemcsak a citokinek mérésénél nyújtanak segítséget, hanem más fehérje és génexpressziós profilok, autoimmun betegségek, genetikai betegségek és HLA vizsgálatok terén is gyors, pontos, átfogó eredményekhez juthatunk.

A labordiagnosztika mai színvonala tehát lehetővé teszi azt, hogy ne izoláltan, egy-két citokinre vonatkozóan lehessen adatokat gyűjteni, hanem meg lehessen határozni az egy adott betegre, betegségre jellemző citokinprofilt. Az eredmények értékelését azonban megnehezíti az a tény, hogy

(1) nem ismert, hogy a különböző multiplex rendszerek által mért adatok mennyire állnak összhangban;

(2) kevés az arra vonatkozó adat, hogy az egy adott multiplex rendszerben mért értékek mennyire reprodukálhatóak;

(3) a nagyszámú adat feldolgozása, az egy adott betegből ismételten végzett mérések eredményének az értékelése új statisztikai megközelítéseket indokolnak – ezek pedig nem adottak.

Ph.D. munkám során célom volt ezekre a metodikai kihívásokra választ találni, illetve néhány belgyógyászati kórkép esetében a citokinprofilra vonatkozóan releváns adatokat gyűjteni.

3 Célkitűzések

Ph.D. munkám során metodikai és klinikai kérdésekre kerestem választ. A módszertani vizsgálatokon belül a citokinszintmérési módszerek összehasonlítása volt az elsődleges célom.

Mivel a különböző mérési rendszerek között lényeges különbségek vannak, és ez megnehezíti a kapott eredmények összehasonlítását, ezért a különböző multiplex rendszerek alkalmazásával nyert értékek összehasonlítására vonatkozóan szükséges annak a vizsgálata, hogy két multiplex rendszer (Biochip® és Bioplex®) eredményei mennyire szorosan függnek össze, illetve, hogy az ezekkel mért egyik analit (IL-6) érték összevethető-e az egyedi IL-6 szintet mérő kemilumineszcens immunkémiai (Roche) teszttel kapott eredményekkel. Ph.D. munkám során ezért az első célkitűzésem az volt, hogy az egyes citokinszint mérési módszereket összehasonlítsam. Ennek kapcsán két multiplex rendszer (Biochip® és Bioplex®), valamint egy egyedi IL-6 szint-mérő módszer eredményeit vetettem össze és határoztam meg a közöttük levő kapcsolat erősségét.

A citokin-profil vizsgálata különösen jelentős fiziológiás és patológiás körülmények között, perinatális korban. Az újszülöttkori posztaszfixiás agykárosodásban illetve az aktivált immunsejtek okozta idegsejt-károsodásokban a gyulladásos citokinek szintje perinatális aszfixiát követően ugrásszerűen nő. Nem ismert, hogy a terápiás célú hipotermia hogyan módosítja a pro- és antiinflammatorikus citokinek kinetikáját, ezért egyik célkitűzésünk a hipotermia ilyen irányú hatásainak a jellemzése volt.

Vizsgálataink következő fázisában arra kerestük a választ, hogy milyen hatással van az endogén kortizol a szisztémás citokinszintekre kora- és újszülöttkorban**.** A magzati korban az immunrendszer generalizált aktivációja koraszülöttek egy részében az adekvát terápia ellenére is súlyos gyulladásos szövődményeket, elsősorban légzőszervi és idegrendszeri károsodásokat okoz. Kutatásaink során ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen kapcsolat áll fenn koraszülötteknél az egyik legfontosabb gyulladást befolyásoló hormon, az endogén módon szintetizált kortizol és a gyulladásos citokinek szintje között.

Kutatásaink kiterjedtek a perinatális szepszis és citokinprofil közötti kapcsolat felderítésére is, mert kora- és újszülöttkorban a szisztémás bakteriális fertőzés sokszor

rapid lefolyású, és a gyors diagnózis alapvetően fontos a hatékony terápia mielőbbi bevezetése és a súlyos szövődmények megelőzése érdekében. Ezért elemezni kívántuk, hogy a bioplex módszer segítségével meghatározott citokinszintek adnak-e járulékos információt szeptikus újszülötteknél a prokalcitonin- és CRP-szintek mellett.

A következő témakör, amivel foglalkozni kívántunk, az a citokinprofil változása májbetegségekben, és a fémionok összefüggése a szisztémás citokinszintekkel. Hazánk közismerten élen jár az alkoholfogyasztás okozta súlyos májkárosodások terén. A fiatalok körében egyre népszerűbb a vörösborfogyasztás, így munkám során a mérsékelt de rendszeres vörösborfogyasztás hatását tanulmányoztuk a citokinszintekre.

Számos kísérleti adat és klinikai megfigyelés utal arra is, hogy a májkárosodás kialakulásában a szabad gyökök által kiváltott toxikus hatásokkal, így a szabad gyök indukálta gyulladással szembeni nemtől függő érzékenység is szerepet játszik.

A mérsékelt vörösborfogyasztás szisztémás gyulladásra, a fémionok szintjére és a redox-homeosztázisra gyakorolt hatásait vizsgáltuk egészséges férfiakban és nőkben, és elemezni kívántuk, hogy ezek a hatások mutatnak-e eltérést a nemek között.

A laboratóriumi vizsgálatok során tapasztalt „anomáliákra" kívántunk fényt deríteni az egyes májcirrhosis megbetegedések kapcsán a citokinprofil tekintetében. A májfibrózis és májcirrhosis ugyanannak a kórfolyamatnak a különböző állomásai. A májcirrhosis kialakulásában számos pathobiokémiai folyamat játszik szerepet, többek között a gyulladás. A gyulladás jellege és intenzitása a különböző eredetű cirrhosisokban eltérő. Célkitűzésünk az egyes cirrhosis-típusokra jellemző szisztémás citokinprofil meghatározása és az egyes kórformákra specifikus citokinek azonosítása volt.

A Wilson-kór a májban zajló rézmetabolizmus autoszomális recesszív módon öröklődő rendellenessége, aminek az eredményeként a hepatocitákban és egyes extrahepatikus szervekben, így az agyban és a szaruhártyában réz rakódik le. Különösen fontosnak tartottuk, e viszonylag ritka betegség esetében is elvégeni a citokinszintek meghatárosát, tekintettel arra, hogy a Wilson-kór különböző stádiumaiban jelentős eltérések mutatkoztak a fémionháztartásban és a redox-paraméterek alakulásában. Az azonos pathomechanizmus ellenére a megjelenő tünetek nagymértékben változnak interindividuális variabilitást mutatnak, ezért célkitűzésünk a kezelt, normalizált rézszintű Wilson kóros betegeknél annak a vizsgálata volt, hogy az eltérő

tünetcsoportokban szenvedő betegeknél milyen különbségek lehetnek jelen a szisztémás gyulladást jelző citokinszintek, a fémionszintek és redox-folyamatok esetében.

Kutatásaink egyéb belgyógyászati kórképekre is kiterjedtek, a klinikai betegellátás igényének megfelelően. A prosztata adenocarcinomája a gazdaságilag fejlett társadalmakban az egyik leggyakoribb rákos megbetegedés a tüdő daganata után a férfiak daganatos halálozásában. Rosszindulatú daganatos betegségekben szenvedő betegeknél általános gyakorlat, hogy a beteg vény nélkül szed különböző bioaktív készítményeket, például vitaminokat, gyógynövénykivonatokat, antioxidánsokat. Ezek több esetben is enyhítik a kemoterápia kedvezőtlen mellékhatásait, sőt, akár még a kezelés eredményét is javíthatják. Célkitűzésünk áttétes prosztata karcinómás betegeknél annak a vizsgálata volt, hogy egy antioxidánsban gazdag étrendkiegészítő (céklapor) milyen hatást gyakorol szisztémásan a redox rendszerek aktivitására, a citokinszintekre és növekedési faktorokra.

Hasonló megkeresés miatt foglakoztunk a vesetranszplantáció, malnutríció és gyulladás kérdéskörével is, mivel a krónikus betegségekhez kapcsolódó senyvesztő állapot (protein-energy wasting - fehérje-energia hiányos állapot) és a gyulladás közötti kapcsolat krónikus vesebetegek esetében jól ismert. Az állapot felismerése a betegek gondozása miatt nagyon fontos. Ismert, hogy a malnutríció-gyulladásos komplex szindróma (MICS) esetén a morbiditás és a mortalitás többszörösére emelkedik. A MICS kimutatására a beteg klinikai állapota alapján egy pontrendszert (Malnutrition Inflammation Score, MIS) dolgoztak ki. Célkitűzésünk egy eddig MICS tekintetében nem vizsgált populációban, vesetranszplantáció utáni betegeknél a MIS validálása a gyulladásos citokinszintek alapján, illetve különböző modellek felhasználásával annak a meghatározása, hogy a MICS kialakulásában milyen gyulladásos és/vagy tápláltsági faktorok játszanak szerepet.

4 Betegek, módszerek és anyagok

Az egyes vizsgálatokba a betegek bevonása intézeti tudományos kutatásetikai bizottságok előzetes jóváhagyását követően történt. (TUKEB 69/2000, 591/KO/2004, 175-1/2005, 49/2006) A vérvételek előtt a résztvevők tájékoztatást követően beleegyezésüket adták; kiskorúak esetében a szülő (gondviselő) járult hozzá a vizsgálat végzéséhez. Törekedtünk arra, hogy a vérvételek ne jelentsenek külön megterhelést, ezért amikor lehetőségünk nyílt rá, a kutatási célú citokinszint-méréseket az egyéb diagnosztikus célú vérvételekkel összehangoltuk.

A vérvételek során (amennyiben külön nem jelöltem) 5 ml natív vérmintát vettünk le. A szérumot egyrészt a rutinlaboratóriumi vizsgálatok elvégzésére használtuk fel, másrészt a citokinmérések elvégzéséig összegyűjtöttük, és a -80 °C-on tároltuk.

4.1 Mérőmódszereket összehasonlító vizsgálatokban résztvevők

Húsz egészséges önkéntestől (20 – 50 év, 15 nő, 5 férfi) vettünk le 10 – 10 ml natív vérmintát, amiből szérumot szeparáltunk.

4.2 Klinikai vizsgálatokban résztvevő személyek

4.2.1 Perinatális vizsgálatok

4.2.1.1 Aszfixiás újszülöttek

Vizsgálatunkba 19, hipoxiás encefalopátiában szenvedő újszülöttet vontunk be, akik 2005 január és 2006 november között az I.sz. Gyermekklinika Perinatális Intenzív Osztályán kerültek felvételre. A gyermekek állapotát klinikai, neurológiai és EEG kritériumok alapján értékeltük [*Azzopardi és mtsai* 2008], majd a gyermekeket a nemzetközi TOBY (*'Whole body hypotermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy'*) vizsgálatba (ISRCTN 89547571) vontuk és véletlenszerűen két csoportba: szisztémás hipotermiával kezelt (n = 10), illetve normotermia mellett kezelt (n = 9) csoportokba soroltuk. 1. táblázat

A mérsékelt szisztémás hipotermiával (rektális hőmérséklet 33 – 34^{o}C) kezelt csoport esetében a hűtés a hatodik posztnatális órán belül elkezdődött; a hipotermiát 72 órán keresztül hűtőmatrac segítségével tartottuk fenn. A normotermiás csoportban a hőmérséklet 37,0 ± 0,2^{o}C volt. Ezen túl az összes gyermek ugyanolyan standard intenzív terápiás ellátásban részesült, ennek kapcsán rendszeresen, a TOBY

protokollnak megfelelő módon kaptak morfint is [*Azzopardi és mtsai* 2008]. Egyetlen gyermeknél sem volt jelen szepszis, anyai korioamnionitisz.

Kardiovaszkuláris instabilitás esetén (az átlagos artériás vérnyomás 40 Hgmm alatti) a gyermekek egyszer vagy többszöri adagban kaptak fiziológiás sóoldatot (10 – 20 ml/ttkg). Perzisztáló hipotónia esetén a gyermekek dobutamint (5 – 20 µg/ttkg*min^{-1}) vagy dopamint (2 – 10 µg/ttkg*min^{-1}) vagy noradrenalint (0,1 – 0,3 µg/ttkg*min^{-1}) kaptak. Terápiarezisztens esetekben hidrokortizol (1-2 mg/ttkg) adására is sor került.

Az aszfixiás újszülöttek klinikai jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: Aszfixiás újszülöttek klinikai jellemzői

	Hipotermia n = 10	Normotermia n = 9
Gesztációs kor (hét)	39 [37-41]	39 [35-40]
Születési súly (g)	3350 [2300-4340]	3500 [2540-4040]
Hüvelyi szülés	9/10	6/9
Sürgősségi császármetszés	1/10	3/9
Mellkasi kompressziókkal újraélesztés (n/N)	5/10	5/9
Spontán légzés visszatérésének az időtartama (perc)	10 [5 – 15]	15 [7 – 120]
Apgar pontérték 1 min	2 [0 – 8]	2 [0 – 5]
Apgar pontérték 5 min	6 [3 – 8]	3 [0 – 7]
Apgar pontérték 10 min	6 [3 – 7]	5 [1 – 8]
Első mért pH	7,21 [7,06 – 7,34]	7,09 [6,80 – 7,29]
Első mért base excess (mmol/l)	-13,2 [-21,0 – -8,0]	-17,8 [-23,0 – -7,0]
Első mért laktát (mmol/l)	9,7 [6,0 – 15,0]	7,8 [6,1 – 15,0]
Az anyagcsereállapot meghatározásának az időpontja (életóra)	1,38 [0,5 – 3,33]	1,45 [1,0 – 4,5]
Randomizálás időpontja (életóra)	3,3 [2,5 – 5,3]	3,1 [2,5 – 5,5]
Sarnat stádium (n) 1 / 2 / 3	1 / 8 / 1	1 / 6 / 2
Hőmérséklet a hatodik életórában (^{0}C)	33,6 [33,4 – 33,7]	36,7 [35,7 – 36,9]*

4.2.1.2 Kissúlyú koraszülöttek

Negyven, a Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Perinatális Intenzív Centrumában ellátott 1500 gramm születési súlyú koraszülöttől

vettünk 0,5 ml lítium-heparinnal alvadásgátolt vérmintát a születéskor, majd az 1, 3. és 7. életnapon; a citokinszinteket az ebből nyert plazmában határoztuk meg. A születési súly mellett kritérium volt, hogy a résztvevők mindegyikétől minden vérminta rendelkezésre álljon (ne következzen be az első héten haláleset), illetve, hogy a koraszülöttek ne részesüljenek glükokortikoid-kezelésben.

4.2.1.3 Perinatális szepszisben szenvedő koraszülöttek

A Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Perinatális Intenzív Centrumában 2007 január 1 és 2008 december 31 közötti szepszis diagnózissal kezelt 41 kora- és újszülöttől vett vérmintában a beküldő osztály kérésének megfelelően prokalcitonin, CRP és vérkép-meghatározásokat végeztünk az antibiotikum-kezelés megkezdése előtt, majd azt követően az első és a második napon. A megmaradt vérmintákban mértük a citokinszinteket.

Az általunk alkalmazott szepszis-kritériumok [*Dollner és mtsai* 2001, *Treszl és mtsai* 2003]:

- klinikai tünetek (1) sápadtság és icterus; (2) letargia, apnoe, bradycardia, ingerlékenység és görcsrohamok; (3) tachypnoe és dyspnoe; (4) alacsony vérnyomás, tachycardia és mikrocirkulációs zavar; (5) hányás és hasfali feszülés; (6) láz és hőmérséklet-instabilitás.
- laboratóriumi tünetek: CRP szint >20 mg/l (és/vagy prokalcitonin >10 μg/l) és a fehérvérsejtszám >20 G/l.

Definíciónk szerint szepszis akkor volt jelen, ha pozitív hemokultúra vagy jellegzetes laboratóriumi tünet mellett a fenti klinikai tünet-kategóriákból legalább 3, illetve pozitív hemokultúra vagy ha pozitív hemokultúra / jellegzetes laboratóriumi tünet nélkül a fenti klinikai tünet-kategóriákból legalább 4 volt jelen.

4.2.2 Citokinek májbetegségekben.

4.2.2.1 Vörösbort fogyasztó önkéntesek

Vizsgálatunkba egyetemi hallgatókat: 10 nőt (életkoruk 23 ± 3 év, testtömegük 60 ± 4,1 kg), illetve 11 férfit (életkoruk 23 ± 3 év, testtömegük 79 ± 5,3 kg) vontunk be. A fizikális orvosi vizsgálat, a rutinlaboratóriumi paraméterek, valamint az anamnézis alapján mindegyikük egészséges volt. Rendszeresen egyikük sem fogyasztott alkoholt

(átlagos alkoholbevitel: <20 gramm/hét), nem dohányoztak, nem szedtek étrendkiegészítőt, illetve a nők nem használtak fogamzásgátló tablettákat sem.

A vizsgálat kezdetekor vért vettünk tőlük; ezt követően a férfiak naponta 3 dl, a nők 2 dl vörösbort fogyasztottak (Egri Cuvée, König Pincészet). A vörösbor alkoholtartalma 12%, resveratrol tartalma 12,03 mg/l volt. A következő vérvételre egy hónap múlva került sor.

4.2.2.2 Krónikus májbetegségben szenvedők

Vizsgálatunkban 75 kompenzált májcirrhosisban szenvedő beteg vett részt, akiket a Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinika hepatológiai ambulanciáján gondoztak. A betegek közül 36-an alkoholos eredetű cirrhosisban (10 nő, 26 férfi; átlagos életkor 54 ± 8 év), 25-en primer biliáris cirrhosisban (PBC) (22 nő, 3 férfi; átlagos életkor 41 ± 9 év), 14-en pedig krónikus HCV talaján kialakult cirrhosisban (6 nő, 8 férfi; átlagos életkor 48 ± 7 év) szenvedtek. A betegek nem részesültek interferon-kezelésben, és nem kaptak interleukin-készítményeket sem. Kontrollcsoportként 26 (12 nő, 14 férfi, átlagos életkor 58 ± 8 év) egyén szerepelt, akiknek az általános egészségi állapotát a klinikán mérték fel, de akiknél a rutinlaboratóriumi vizsgálatok és a fizikális vizsgálat nem igazolt betegséget.

4.2.2.3 Wilson-kóros betegek

Wilson-kórral kapcsolatos vizsgálatainkban Semmelweis Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinika hepatológiai ambulanciáján gondozott betegek, összesen 50-en vettek részt. 81%-uknál igazolták M1069Q a Wilson kórra jellemző génmutáció jelenlétét. A 19 nő életkora átlagosan 37 ± 11 év, a 31 férfié 33 ± 10 év volt. A diagnózistól 12 ± 4 év telt el.

A kelátor terápiában (D-penicillamin kezelésben) részesülő betegek 46 %-nál a terápia mellett is súlyos idegrendszeri tünetek álltak fent, 14 %-nál májenzim eltérések, míg 12 %-nál idegi és májenzim eltérések együttesen is kimutathatók voltak, míg 28 %-ukban az előbbi tünetek nem jelentkeztek. A kórra jellemző Kayser-Fleischer gyűrű-pozitivitást leggyakrabban az idegi és májenzim eltéréseket együttesen prezentáló betegek esetében (80 %) találtunk.

4.2.3 Citokinek egyéb belgyógyászati kórképekben

4.2.3.1 Prosztatakarcinóma és citokinprofil

A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikáról 18 áttétes prosztatarákos beteget (életkor: 68 ± 5,6 év) vontunk be, akik a kemoterápiás Tamoxifen kezelés mellett egy kereskedelmi forgalomban kapható, présléből, alacsony hőmérsékleten végbemenő vákuumszárítási technológiával előállított céklaport (Engedélyszám: 1361/004/2003) kaptak terápia szupplementumként 1 hónapig. A vérvételre a céklaporszedés kezdetekor, illetve egy hónap után került

4.2.3.2 Vesetranszplantációt követő állapot

A Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinikán gondozott stabil állapotú vesetranszplantált betegeket vontuk be a vizsgálatba; klinikai adataikat a.2. táblázat összegzi.

A bevonni kívánt 1214 betegből 205 (17%) nem kívánt a vizsgálatban részt venni, a betegek közül 16-ot (1%) pedig a kizárási kritériumok (utóbbi 4 hétben akut rejekció, aktuális kórházi kezelés, 3 hónapon belül transzplantáció, akut fertőzés, vérzés) miatt kizártunk. A vizsgált betegpopuláció ezért 993 betegből állt. A résztvevők között kisebb arányban szerepeltek a férfiak, mint az eredeti populációban (57% *vs.* 67%; $p<0.01$).

A veseelégtelenség hátterében álló leggyakoribb ok a krónikus glomerulonephritis volt (23%). További okok: diabeteses nephropathia 5%; autosomalis domináns polycystás vesebetegség 18%; krónikus pyelonephritis és tubularis interstitialis betegség 13%; magas vérnyomás okozta nephropathia 6%. Egyéb vagy ismeretlen eredetű vesebetegségben a betegek 35 százaléka szenvedett.

A vizsgálat időpontjában a betegek 81%-a szedett prednizolont, közel 50 százalékuk pedig ciklosporin A-t kapott. A betegek mintegy 40 százaléka kapott takrolimuszt, 4%-a azatioprint, 8 százaléka szirolimuszt.

A vese beültetésekor az átlagos hideg iszkémiás időtartam 21 óra volt, késői graftműködés a betegek 26%-nál, míg akut rejekció 34%-nál szerepelt az anamnézisben. Élődonoros transzplantációt az esetek 4 százalékában végeztek. A donorok 64 százaléka férfi, átlagos életkora 43 ± 14 év volt.

2. táblázat: Avesetranszplantált betegek kórtörténeti adatai *(rövidítés: IQR= interkvartilis)*

	Összes beteg (n = 993)	Férfiak (n = 569)	Nők (n = 424)	p
Életkor (év) (átlag ± szórás)	51 ± 13	50 ± 13	52 ± 12	<0,05
Utolsó transzplantáció óta eltelt idő hossza; (hónap; medián, IQR)	72 (75)	72 (72)	72 (81)	NS
Megelőző dialízis időtartama (hónap; medián, IQR)	20 (29)	20 (31)	20 (27)	NS
Becsült GFR (ml/perc/1,73 m^2) (átlag ± szórás)	51 ± 21	53 ± 20	48 ± 21	<0,001
Cukorbetegség jelenléte (%)	21	21	20	NS
Hemoglobinszint (g/l) (átlag ± szórás)	135 ± 17	140 ± 17	127 ± 14	<0,001
Koleszterinszint (mmol/l) (átlag ± szórás)	5,50 ± 1,28	5,36 ± 1,16	5,69 ± 1,39	<0,001
Panel reaktív ellenanyag titer (%) (medián; min, max,)	0; 0-85	0; 0-85	0; 0-85	NS
Hideg iszkémiás idő hossza (perc) (átlag ± szórás)	1248 ± 349	1241 ± 356	1257 ± 340	NS
Anamnézisben graftfunkció megindulásának a késlekedése (%)	26	30	21	<0,01
Akut rejekció az anamnézisben (%)	34	34	35	NS

A betegeknél 2007 február és augusztus között az alábbi adatlap (3. táblázat) segítségével meghatároztuk a malnutríciós-gyulladásos pontértéket (MIS).

3. táblázat: Malnutríció – inflammáció pontérték megállapításához használt adatlap

Malnutríciós-gyulladásos pontérték (MIS)			
0	1	2	3
1 – Súlyváltozás (az elmúlt 3 – 6 hónap során bekövetkező súlyváltozás):			
Súly nem változott, vagy a fogyás <0,5kg	Kisebb mértékű fogyás (>0,5kg, de <1kg)	1 kg-ot meghaladó fogyás, de <5%	Fogyás >5%
2 – Étrend, táplálékbevitel			
Jó étvágy, a táplálékbevitel nem változott	Valamelyest szub-optimalis a szilárd étel fogyasztása	Szilárd étel fogyasztás közepes mértékben csökkent – teljes mértékben folyadékfogyasztás	Hipokalóriás folyadék – éhezés
3 – Gasztrointesztinális tünetek:			
Nincs tünet, jó az étvágy	Enyhe tünetek, nincs étvágy, esetenként émelygés	Esetenként hányás vagy közepes fokú GI tünetek	Gyakori hasmenés vagy hányás vagy súlyos étvágytalanság
4 – Funkcionális kapacitás (táplálkozással kapcsolatos funkciócsökkenés):			
Funkcionális kapacitás normális – javult, jól érzi magát a beteg	Felkeléssel esetenként problémák vannak, gyakran érzi magát fáradtnak	A beteg függetlenségét igénylő tevékenységek (pl. fürdés) végzésével problémák vannak	Ágyhoz / tolószékhez kötöttség, nincs, vagy kismértékű a fizikai aktivitás
Az ESRD-t leszámítva egyébként egészséges	Enyhe társbetegség (kivéve az MCC*)	Közepes társbetegség (1 MCC*)	Súlyos többszörös társbetegség (legalább 2 MCC*)
6 – Zsírraktárak csökkentek, vagy a szubkután zsír mennyisége kisebb (szem alatt, triceps, biceps területén, mellkason):			
Normális (nincs változás)	enyhe	közepes	súlyos
7- Izomvesztés jelei (kulcscsont, lapocka, borda területén, quadriceps izomzat, térd területén)			
normális (nincs változás)	enyhe	közepes	súlyos
8 – Testtömegindex: BMI = testtömeg (kg) / magasság² (m)			
≥20	18-19,99	16-17,99	BMI<16
9 –Se albumin (g/l)			
≥40	35-39	30-34	<30
10 – Se transzferrin (g/l)			
≥0,200	0,170-0,199	0,140-0,169	<0,140
Teljes pontérték = a fenti tíz tétel összege (0-30):			

*MCC (fontosabb komoborbid állapotok) így III. vagy IV. stádiumú szívelégtelenség, AIDS, súlyos koszorúér-betegség, közepes – súlyos obstruktív tüdőbetegség, idegrendszeri szövődmények, áttétes daganat és/vagy kemoterápia.

4.3 Módszerek

4.3.1 Citokinszint-mérési eljárások

4.3.1.1 Citokinszintek mérése Bioplex rendszerrel

A vizsgálatokat Bio Rad Bio-Plex System teszttel Luminex® 200™ (Austin, USA) készülék segítségével végeztük.

A mérés elve:

A színkódolású mikrorészecskéket előzetesen analit-specifikus antitestekkel vonják be. A mikrorészecskéket, a standardokat és a mintákat a mintahelyekre adagolják, és az immobilizált antitestek megkötik a kimutatandó analitokat. A nem kötődött analitok mosása után a vizsgálandó analitra specifikus biotinilált antitest-keveréket adagolnak mindegyik mintahelyre. A nem kötődött biotinilált antitestek eltávolítását célzó mosás után streptavidin-fikoeritrin konjugátumot (Streptavidin-PE) adagolnak mindegyik mintahelyre, amely hozzákötődik a biotinilált detekciós antitestekhez. Egy utolsó mosás eltávolítja a nem kötődött Streptavidin-PE-t, és a mikrorészecskéket ezután újra szuszpendálják pufferben, majd a méréseket Luminex analizátoron végzik. A mérés során a készülék kétféle lézert használ: az egyik lézer mikrorészecske-specifikus, amely meghatározza, hogy melyik analitot vizsgáljuk, a másik lézer a fikoeritrin által adott szignál erősségét jelzi, amely egyenesen arányos a megkötött analit mennyiségével.

A mérés menete:

A mikrorészecske-koncentrátumokat a mellékelt keverőüvegben hígítottuk. A 4. táblázatban látható mikrorészecske- koncentrátum mennyisége minden egyes analitra értendő (pl. teljes tálca IL-1β és IL-6 mérése esetén adjunk 50µl IL-1β mikrorészecske-koncentrátumot és 50µl IL-6 mikrorészecske- koncentrátumot 5 ml mikrolemez hígítóhoz.)

4. táblázat: Mérési helyek kiosztása a 96-os plate-en

Felhasznált mérési helyek	Mikrorészecske koncentrátum	Mikrorészecske hígító
96	50 µl	5 ml
72	37,5 µl	3,75 ml
48	25 µl	2,5 ml
24	12,5 µl	1,25 ml

A vizsgálatokat RD6-40 Kalibrátor diluenssel négyszeresre hígított szérum- és plazmamintákból végeztük.

Ezt követően az alábbi lépések történtek:

1. A leírás szerint a reagenseket, mintákat és standardokat előkészítettük. Előre megnedvesítettük a lemezt 100 µl mosópuffer hozzáadásával. Eltávolítottuk a folyadékot a mérőhely alján lévő szűrőn át, a mikrolemezhez tervezett vákuumelosztóval.
2. 50 µl hígított mikrorészecske keveréket adtunk mindegyik mérőhelyre.
3. 50 µl standardot vagy hígított mintát adtunk az adott mérőhelyre. 3 órán keresztül mikrolemezrázón inkubáltuk
4. A lemezt úgy mostuk, hogy a folyadékot mindegyik mérőhelyről eltávolítottuk, majd minden mintahelyet megtöltöttünk mosópufferrel (100 µl), és ismételten eltávolítottuk a folyadékot. A mosást háromszor ismételtük.
5. 50 µl hígított Biotin Antitest koktélt adtunk mindegyik mérőhelyre, majd a lemezt rázókészüléken inkubáltuk 1 órán át.
6. A mosást a 4. pontnak megfelelően megismételtük.
7. 50 µl hígított Streptavidin-PE-t adtunk mindegyik mintahelyre
8. 30 percen át rázón inkubáltuk.
9. A mosást a 4. pontnak megfelelően megismételtük.
10. 100 µl mosópuffert adtunk mindegyik mintahelyre, majd 2 percig inkubáltuk.
11. Luminex analizátor felhasználásával az eredményt 90 percen belül olvastuk le.

Az eredmények kiszámítása:

A Standard Érték kártyákon lévő koncentrációk felhasználásával kiszámítottuk a háromszoros hígítási sor koncentrációit az egyes hígításokra. Mindegyik standard és

minta duplikált eredményeinek átlagát vettük és kivontuk az átlag vak RFU (relative fluorescens unit) középértékét.

Standard görbét készítettünk mindegyik analitra számítógépes 5-PL görbe illesztéssel, amelyet számítógépes szoftveres adatredukció segítségével állítottunk elő.

Alternatív megoldásként készítettünk standard görbét úgy, hogy az y tengelyen mindegyik standardra bejelöltük a median RFU értéket az x tengelyen lévő koncentrációs értékekkel szemben, és a pontoknak legjobban megfelelő görbét ábrázoltuk. Az adatok lineárissá tehetők még a citokin-koncentráció logaritmikus értékeinek és az RFU logaritmikus adatainak ábrázolásával. Az ehhez legjobban illő egyenes ezután regressziós elemzéssel meghatározható.

Az egyes minták citokin-koncentrációjának meghatározásához először megkerestük az y tengelyen az RFU értéket, melyet a standard görbére vetítettünk. A metszéspont segítségével az x tengelyen leolvastuk a megfelelő citokinkoncentrációt.

Mivel a mintákat hígítottuk, a standardgörbéről leolvasható koncentrációt meg kellett szorozni a hígítási faktorral. Az assay-t az R&D által előállított, magas tisztaságú rekombináns humán citokinekkel szemben kalibráltuk.

4.3.1.2 Citokinszintek mérése Biochip rendszerrel

A mérés elve:

Az Evidence Investigator™ Biochip Array (Randox Ltd, Crumlin, United Kingdom) technológia egy mintából egyszerre több analit kvantitatív meghatározására használható. A Randox Biochip technológia egy szilárdtest eszköz alkalmazását jelenti, melyben az egyes tesztrégiók különböző citokinekre és növekedési faktorokra specifikus immobilizált antitesteket tartalmaznak. A citokin meghatározására sandwich kemilumineszcens immunoassayt (enzimmel jelölt antitest próba) használnak. A minta magas citokinszintje nagy torma-peroxidázzal jelölt antitest-kötődést, így nagy kibocsátott kemilumineszcenciát eredményez.

A biochip egyes tesztrégiói által kibocsátott fényt digitális képfeldolgozási technika érzékeli, majd egy tárolt kalibrációs görbe értékeivel hasonlítja össze. A minta analit-koncentrációját a kalibrációs görbe alapján határozza meg.

Számos, az Evidence Investigator™ segítségével meghatározható különböző immunoassay alapú, egyszerre több analit vizsgálatát lehetővé tévő próbát fejlesztettek ki.

Az evidence investigator™ Citokin Array egyszerre határozza meg az IL-1α, IL-1ß, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, IFNγ, EGF, MCP-1 és TNFα szintet.

A mérés menete:

1. Cellánként 200 µl diluenst használtunk.
2. Cellánként 100 µl kalibrátort / mintát juttattunk a tálcára.
3. A tálcát a termoséker lapjára rögzítettük, majd 1 órán át 37°C-on 370 rpm sebességgel inkubáltuk.
4. Az inkubációt követően a hordozókat tartalmazó tálcát eltávolítottuk el a termosékerről. A reagenseket egy hirtelen mozdulattal kiürítettük a tálcáról.
5. Közvetlenül ezután két ciklusban lemostuk a tálcát. A hígított mosópuffert tartalmazó mosópalack segítségével minden cellához 350 µl mosópuffert adtunk, óvatosan megmozgatva, hogy az esetleg a biochipek alá került reagenst is eltávolítsuk, majd egy hirtelen mozdulattal kiürítettük. Ezután még további 4 mosási ciklust vittünk véghez. Minden ciklus alatt a biochipeket 2 percen át hagytuk állni a mosópufferben.
6. Az utolsó mosás után a hordozót óvatosan szűrőpapírra helyeztük a maradék puffer eltávolítása érdekében.
7. Azonnal 300 µl konjugátumot pipettáztunk minden cellába.
8. Óvatosan megmozgattuk a tálcát.
9. A tálcát a termoséker lapjára rögzítettük, majd 1 órán át 37°C-on 370 rpm sebességgel inkubáltuk.
10. Az inkubációt követően a hordozókat tartalmazó tálcát eltávolítottuk a termosékerről. A reagenseket egy hirtelen mozdulattal kiürítettük a tálcáról.
11. Közvetlenül ezután a tálcát két ciklusban mostuk. A hígított mosópuffert tartalmazó mosópalack segítségével minden cellához 350 µl mosópuffert adtunk. Ezt további 4 mosási ciklus követte. Minden ciklus alatt a biochipeket 2 percen át állni hagytuk a mosópufferben.
12. Az utolsó mosás után megtöltöttük a cellákat mosópufferrel, és közvetlenül a képfeldolgozásig, de maximum 30 percig abban hagytuk a hordozókat.
13. A hordozókat egyenként dolgoztuk fel. A feldolgozásra váró hordozókat fénytől óvtuk.

14. Közvetlenül a jelölő hozzáadása előtt a mosópuffert egy határozott mozdulattal eltávolítottuk, majd a hordozót szűrőpapírra helyeztük a maradék mosópuffer eltávolítása érdekében.
15. Ezután 250 µl aktív jelölő reagenst adtunk minden cellához és letakartuk a fényvédelem céljából.
16. 2 perccel azután, hogy az utolsó cellához hozzáadtuk a jelölő reagenst, a tálcát az Evidence Investigator készülékbe helyeztük.
17. A képek feldolgozása ezután automatikusan elindul.

Az eredmények kiszámítása:

A beépített erre a célra fejlesztett szoftver segítségével az eredmények azonnal feldolgozása és kiértékelésre kerültek.

4.3.1.3 Egyedi citokinszint-mérések

4.3.1.3.1 IL-6-szint mérése Roche Modular E170 analizátorral

A mérés elve:

Az egyedi IL-6 szinteket Roche Modular E 170 analizátorral, elektrokemilumineszcens immunoassay-vel határoztuk meg. A teszt kifejlesztésénél a szendvics-elvet vették alapul. A mintát először monoklonális antitest , majd jelölt monoklonális antitest hozzáadásával inkubálja a készülék. A pozitív reakciót a sztredtavidin bekötődése jelzi a chemiluminescens intenzitás megjelenésével.

A mérés menete:

1. inkubáció: 30 µl mintát inkubáltunk biotinizált monoklonális IL-6-specifikus antitesttel.
2. inkubáció: A ruténium komplex-szel a jelölt monoklonális IL-6-specifikus antitest és a sztreptavidinnel fedett mikrorészecskék hozzáadása után az antitestek a mintában található antigénnel immunkomplexet hoznak létre.

A berendezés a reakcióelegyet a mérőküvettába szívja, ahol a mikrorészecskéket (magnetizálható mikropartikulumokat) az elektróda a felszínén mágneses úton befogja. A kötetlen anyagok ezután a mosófolyadék ProCell-lel együtt távoznak a rendszerből. Az elektródára kapcsolt feszültség kemilumineszcens fénykibocsátást indukál, amit egy fotomultiplier mér.

Az eredmények kiszámítása

Az eredményeket a készülék a kalibrációs görbe alapján határozza meg, amelyet készülék-specifikusan, 2-pontos kalibrációval és a reagens-vonalkódból leolvasott kalibráiós-görbe felhasználásával generál.

4.3.1.3.2 IL-6-szint mérése R&D ELISA módszerrel

A mérés elve:

A módszer kvantitatív enzim-immunoassay technikán alapul. IL-6-ra specifikus monoklonális ellenanyagot visznek fel egy mikroplate-re. A standardok és a minták IL-6 mennyisége az immobilizált ellenanyaghoz tapad. A kitapadt IL-6 kimutatására mosást követően enzimhez(torma-peroxidázhoz) kapcsolt poliklonális ellenanyagot visznek be a rendszerbe. Majd újabb mosás történik. Ezután a rendszerben maradt torma-peroxidáz, (mennyisége a mintában levő IL-6 koncentrációtól függ) bontja a kromogént tartalmazó hidrogén peroxid szubsztrátot, aminek a kapcsán a reakcióelegy színintenzitása változik. Ez arányos a minta IL-6 tartalmával. A mérés során a színintenzitás erősségét határozzuk meg.

A mérés menete:

A standardokat és reagenseket az előírásoknak megfelelően a méréshez előkészítettük.

1. A mikroplate egyes mélyedéseibe 100 µl RD1W hígítót (assay diluent reagenst) mértünk be.
2. Az egyes mélyedésekbe 100-100 µl standardot, mintát, vagy kontrollt mértünk be, majd lezártuk a mellékelt fóliával.
3. Két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.
4. Ezt követően az egyes mélyedésekben lévő reakcióelegyet kiszívtuk, majd háromszor mostuk. A mosást 400 µl mosópufferrel (Wash Buffer) végeztük; minden egyes alkalommal a folyadékot teljes mértékben eltávolítottuk.
5. 200 µl IL-6 konjugátumot mértünk be az egyes mélyedésekbe, majd egy új fóliával letakartuk a mikroplate-et. Két órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltunk.
6. Ezt követően négyszer újra mostuk az egyes mélyedéseket.

7. Az egyes mélyedésekbe 200 µl szubsztrátoldatot mértünk be, majd 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, fénytől védve.
8. A reakciót az egyes mélyedésekbe mért 50 µl Stop Solution oldattal állítottuk le. Az oldat színe kékről sárgára változott.
9. 450 nm-s hullámhosszon az abszorbancia értéket az egyes mélyedések esetében 30 percen belül lemértük mikroplate readerrel. Referencia-hullámhosszként 540 nm-t használtunk.

Az eredmények kiszámítása:

Az abszorbanciaértékeket kétszer olvastuk le, a kapott értékeket átlagoltuk. A standard értékekre a mikroplate-reader számítógépes programjának segítségével négy paraméteres logisztikus görbét illesztettünk, az így képzett standardgörbe alapján tudtuk meghatározni az egyes mintákban az IL-6 szintet.

4.3.1.3.3 TNFα-szint mérése R&D Elisa módszerrel

TNFα-szint mérési elve, menete és az eredmények kiszámítása egyezik a 4.3.1.3.2. pont alapján az IL-6 kapcsán bemutatottakkal, azzal a különbséggel, hogy ennél a mérésnél nem IL-6, hanem TNFα monoklonális és poliklonális antitesteket tartalmazott a rendszer.

4.3.2 Egyéb vizsgálatok

A rutinlaboratóriumi mérések és a citokinszint-meghatározások mellett több vizsgálatunk kapcsán a fémionok és a redox-paraméterek meghatározására is sor került.

4.3.2.1 Fémion-meghatározások

A fémion-meghatározásokhoz citrátos vért vettünk; a plazmát és a vörösvértesteket a szokásos módszerekkel választottuk el. A mintákat kétszer 10 percen keresztül 2500 rpm-en centrifugáltuk 4 °C-on. A vörösvértest szuszpenzió méréséhez a minta hemoglobintartalmát egységesen 1 g%-ra állítottuk be. A plazmát és a vörösvértest szuszpenziót is 4 °C-on tároltuk a mérésekig (amelyekre a vérvételt követően 12 órán belül sor került).

A fémion-koncentrációkat ICP-OES készülékkel mértük, ami egy Spectro Genesis készülékhez induktív módon kapcsolt plasma emissziós spektrométer (Kleve,

Germany). A vérminták (1 ml) salétromsav (5 ml) és hidrogénperoxid (2 ml) keverékével történő roncsolása, majd 10 ml desztillált vízzel való hígítása után 15 fémion (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn) szintjét határoztuk meg. A mérések során a vak kivonás, a háttérre való korrekciója mellett háromszor három szekundum integrációs időt használtunk. A kalibrációs görbékhez különböző koncentrációjú (0, 1, 5, 10, 20, 50 µg/ml) standard oldatokat használtunk. Mivel az ICP mérések során a mátrixhatás jelen van, ugyanabban a mátrixban (5% HNO3 oldatok) hígítottuk a standardokat, mint a mintákat [*Szentmihályi és mtsai* 2004].

A szelén a vörsvérsejtekben normál esetben olyan alacsony koncentrációban volt, hogy nem tudtuk kiértékelni. Így előkezelés után a szeléniumtartalmat voltametriás módszerrel a polarográfiás hatás alapján végeztük. [May és munkatársai 2005]

4.3.2.2 Antioxidáns aktivitás meghatározási módszerek

Redukálóképesség meghatározása

Plazma esetében 200 µl mintát használtunk és bidesztillált vízzel 1 ml-re egészítettük ki a térfogatot, majd 2,5 ml 6,6-os pH-jú foszfátpufferrel (0,2 M) és 2,5 ml 1 %-os $K_3Fe(CN)_6$-oldattal elegyítettük, ezután 30 percig 30 ^oC-on inkubáltuk. 2,5 ml 10 %-os triklórecetsav-oldat hozzáadása után a reakcióelegyet 10 percig centrifugáltuk 2500 rpm-mel. A felülúszó 2,5 ml-ét 2,5 ml bidesztillált vízzel összekeverve, majd 0,5 ml 0,1 %-os $FeCl_3$-oldatot hozzáadva, a kialakult szín intenzitása 700 nm-en mérhető, és arányos a minta redukálóképességével. Referenciavegyületként aszkorbinsavat használtunk. A minta redukálóképességét aszkorbinsav ekvivalensben (ASE) adtuk meg. 1 aszkorbinsav ekvivalens az egységnyi térfogatú minta (1 ml) redukálóképessége, ha hatása egyenértékű 1 µmol aszkorbinsavval [*Oyaizu és mtsai* 1986].

H-donor- aktivitás meghatározása

A plazmaminták H-donor aktivitásának meghatározása 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil szabad gyök segítségével történt spektrofotometriásan.

A vizsgálathoz 50 µl plazmát 950 µl bidesztillált vízzel kiegészítettünk 1 ml-re, majd 1 ml metanolt adtunk hozzá. Ehhez 500 µl metanolos DPPH-oldatot (9 mg DPPH 100 ml metanolban oldva) adtunk, és alapos összekeverés után a reakcióelegyet 30 percig 37 ^oC-on inkubáltuk. 10 perces centrifugálást (3000 rpm) követően olvastuk le az abszorbanciát 517 nm-en metanol vakkal szemben. Az eredményt gátlás %-ban adtuk meg:

gátlás % = [Abs(kontroll) - Abs(minta)] / Abs(kontroll)x100] [*Hatano és mtsai* 1988].

Össz –scavenger kapacitás meghatározása

Csekély mennyiségű humán plazmából (0,15 ml), ill. vörösvértestből (0,05 ml) történt a vizsgálat. A kémiai reakció lényegében a H_2O_2/˙OH - mikroperoxidáz - luminol rendszer (pH 10,5) gátlása. A H_2O_2/˙OH - mikroperoxidáz - luminol rendszer lúgos pH-n fényt bocsát ki, mert a vaskomplex hatására a H_2O_2-ból ˙OH˙ gyök keletkezik Fenton-reakcióban, és a gyök a luminolt gerjeszti. A luminol aminoftalát stabil anionná alakul át és hν kvantum (420 nm) távozik. Ha a rendszerhez plazmát vagy vörösvértest-szuszpenziót adunk, akkor ez a kémiai (kemilumineszcencia) reakció gátlódni fog. Az úgynevezett totál scavenger kapacitás értéket (TSC) RLU %-ban (relative light unit) adjuk meg. A méréshez Berthold Lumat 9501 készüléket használtunk [*Blázovics és mtsai* 1999].

4.3.2.3 Transzmetilálás vizsgálata

A transz-metilezési folyamatok molekuláris résztvevőinek összessége nem ismert, de a megköthető HCHO mennyisége addukt-képzést követően analitikai módszerekkel mérhető, alkalmas a mobilizálható -CH_3-pool mennyiségi jellemzésére.

A HCHO-t kromatográfiás elválasztás-technikával dimedon addukt formában (formaldemeton), *Gersbeck és mtsai* [1989] módszerének adaptálásával határoztuk meg. A mintákat 0,05%-os dimedon oldattal kezeltük (0.5 cm^3 minta/ 0.5 cm^3 dimedon). Az így kapott szuszpenziót 10 percig 4^oC-on centrifugáltuk (1500 g). A vizsgálatokhoz a tiszta felülúszót használtuk. A kromatográfiás elválasztást Kieselgel 60 F_{254} vékonyréteg-lapon (Merck Co, Darmstadt, Germany) végeztük, kloroform:diklór-metán 65:35 (V/V) elegyével. A minőségi és mennyiségi azonosítás standard vegyület alkalmazásával történt λ=265 nm hullámhosszon, Shimadzu CS-930 TLC/HPTLC scanner (Shimadzu Co, Kyoto, Japan), segítségével [*Blázovics és mtsai* 2008].

4.3.2.4 Zn-protoporfirin és protoporfirin meghatározás

A meghatározáshoz EDTA-s vért használtunk. 100 µl vérhez 400 µl desztillált vizet adva 30 percig fénytől elzárva végeztük a haemolizálást, majd a haemolizátum 100 µl–hez 6 ml 96%-os etanolt adtunk és 3000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A felülúszóból végeztük a meghatározást. 405 nm hullámhosszúságú fénnyel besugározva

mértük a minta fluorescens emisszióját 570-660 nm között Hitachi F-4010 spektrofluoriméterrel [*Chisolm és mtsai* 1976].

4.4 A vizsgálatokhoz felhasznált vegyszerek és kitek

A rutin kémiai és immunkémiai vizsgálatokat Roche kémiai és immunkámiai tesztekkel végeztük (Roche Hitachi Modulár automatán) Kivételt képez a CRP, melyet Olympus immunturbidimetriás teszttel és PSA free PSA, melyeket Abbott MEIA teszttel métünk. . A rutin hematológiai vizsgálatok Simens Advia 120 hematológiai automatával készültek. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) meghatározása Ransod SDI125 kit leírásában ajánlott módszer szerint történt, a Glutation- peroxidáz (GSH/Pox) meghatározása pedig a Ransel RS505 kit leírása szerint.

Az ICP OES kalibrációhoz Merk ICP standardokat használtunk.
A luminolt, microperoxidast, hydrogen- peroxidot, and 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrasyl gyököt a SIGMA (St.Louis) cégtől szereztük be. A többi kémiai reagenst a Reanal Kft-nél vásároltuk.

4.5 Statisztikai elemzés

A citokinszintek igen nagyfokú egyéni variabilitást mutatnak, ezért nem követnek normál eloszlást. Emiatt az adatokat medián, tartomány, illetve medián, interkvartilis (IQR) tartomány formájában adom meg. A különböző vizsgálati csoportok összehasonlítása nem-parametrikus próbákkal (Wilcoxon, Mann-Whitney, Friedmann-teszt) történt. Bizonyos vizsgálatok kapcsán speciális statisztikai próbákra is sor került, ezeket az 5. pont alatt ismertetem.

A fémek és antioxidánsok vizsgálatoknál átlag és szórás alapján történt a kiértékelés. A statisztikai analízishez az egyutas variancia (ANOVA) analízist használtuk. [*Dinya* 2007]

5 Eredmények

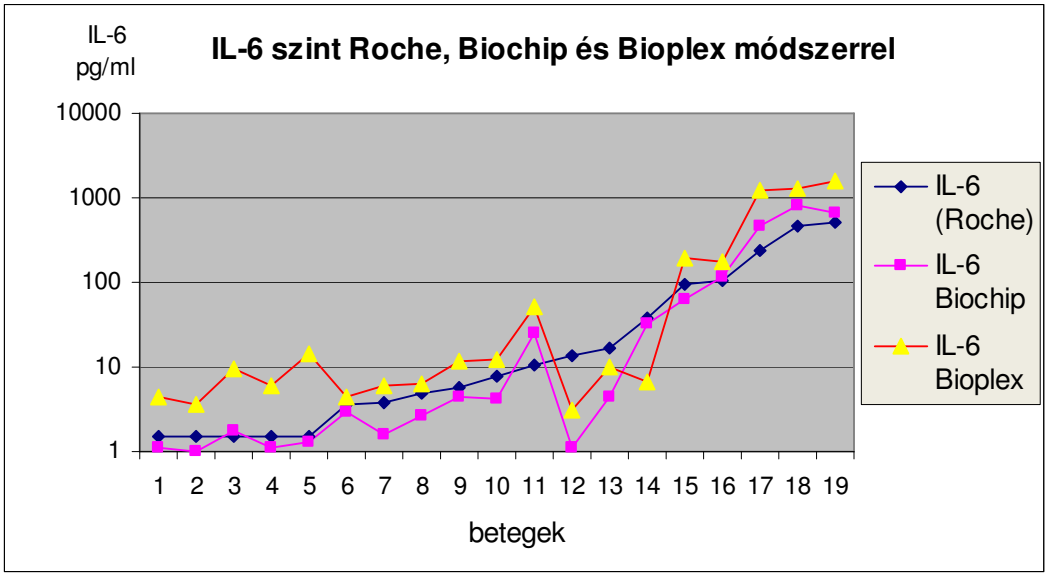
5.1 Összehasonlító vizsgálatok

A különböző mérési rendszerek között lényeges különbségek vannak (antitestek eltérőek, vizsgálat menete változó, eltérő a módszerek érzékenysége stb.) Ez megnehezíti a kapott eredmények összehasonlítását. Az irodalomban a különböző multiplex rendszerek alkalmazásával nyert értékek összehasonlítására vonatkozóan eddig nem jelent meg adat.

Az IL-6-szint esetében alkalmazott Roche, Biochip és Bioplex módszerekkel mért értékeket az 5. táblázat és 4. ábra mutatja. Egy résztvevő esetében mértünk mindhárom rendszerben méréshatár feletti (over the level of detection, OLD) értéket. Az egyes rendszerekben mért IL-6- szintek szorosan összefüggtek egymással, de a Bioplex rendszerrel mért IL-6-szintek közel szignifikáns mértékben magasabbak voltak, mint az Roche ($p = 0,07$), illetve Biochip ($p = 0,06$) rendszerrel mért értékek.

5. táblázat: Egészséges önkénteseknél a különböző rendszerekkel mért szérum IL-6-szintek

Résztvevő sorszáma	**IL-6 Roche pg/ml**	**IL-6 Biochip pg/ml**	**IL-6 Bioplex pg/ml,**
1	1,5	1,09	4,44
2	1,5	1,01	3,56
3	1,5	1,79	9,42
4	1,5	1,09	6,13
5	1,5	1,29	14,3
6	3,6	2,98	4,37
7	3,78	1,62	5,99
8	4,78	2,68	6,2
9	5,65	4,41	11,7
10	7,94	4,2	12,3
11	10,5	24,53	51,1
12	13,5	1,13	3,09
13	17,1	4,5	9,9
14	38,1	32,9	6,49
15	97,4	61,6	198
16	107	114	171
17	243	462	1199
18	472	806	1308
19	525	663	1574
20	OLD	OLD	OLD
módszer		**r érték**	
Roche *vs.* Biochip		**0,98**	
Biochip *vs.* Bioplex		**0,97**	
Bioplex *vs.* Roche		**0,97**	



4**. ábra:** Egészséges önkénteseknél a különböző rendszerekkel mért szérum IL-6-szintek a különböző mérési tartományokban

A Bioplex és a Biochip rendszerekkel meghatározott citokinek szintjét külön is összehasonlítottuk (lásd. 6. táblázat). Az egyes mérési rendszerekkel meghatározott analitok szintjében az összefüggés erőssége nagymértékben analit-függő volt (0,28 és 0,98 között változott). A Bioplex rendszerben több alkalommal mértünk méréshatár (BLD) alatti értéket, mint a Biochip rendszer esetében. A mérhető értékek esetében a Bioplex rendszernél szignifikánsan vagy közel szignifikánsan nagyobb IL-6 ($p = 0,02$), IL-4 ($p = 0,06$) és IFNγ ($p = 0,09$) értékeket mértünk. [*Bekő,* 2008]

6. táblázat: Biochip és Bioplex rendszerekkel mért citokinszintek, és ezek összefüggése *BLD = kimutathatósági határ* alatt

	IL-6		**IL-2**		**IL-8**		**IL-10**		**TNF-α**		**IL-4**		**IFNγ**	
sorszám	**Biochip**	**Bioplex**	**Biochip**	**Bioplex**	**Biochip**	**Bioplex**	**Biochip**	**Bioplex**	**Biochip**	**Bioplex**	**Biochip**	**Bioplex**	**Biochip**	**Bioplex**
1	1,62	5,99	BLD	BLD	7,88	29,10	BLD	2,15	3,02	BLD	4,82	BLD	2,44	BLD
2	1,09	4,44	6,55	BLD	7,80	22,30	1,16	46,43	2,13	BLD	4,69	BLD	2,44	BLD
3	1,01	3,56	BLD	BLD	6,77	24,50	BLD	1,83	2,54	BLD	4,43	BLD	2,44	BLD
4	1,79	9,42	5,30	23,84	8,52	36,70	1,16	6,09	2,95	38,30	5,21	16,00	2,44	68,75
5	1,09	6,13	5,30	1,50	78,23	302	1,53	3,15	3,65	4,64	6,65	2,40	2,95	16,72
6	1,29	14,30	BLD	10,37	32,92	82,10	BLD	5,58	3,02	13,06	6,91	11,04	BLD	51,94
7	>900	15995	6,84	257	970	1608	362	1919	161	715	3,32	101,47	7,98	1194
8	806	1307	8,94	78,37	405	391	70,00	307	98,49	198	7,83	16,00	12,76	227
9	462	1199	7,26	218	461	581	28,00	491	54,71	204	2,78	29,48	2,95	372
10	61,64	197	BLD	3,95	61,64	432	BLD	4,51	3,78	14,27	3,18	BLD	2,28	41,43
11	663	1573	3,00	6,90	663	929	3,79	11,11	14,50	51,48	6,38	5,94	13,01	134
12	4,20	12,29	5,10	BLD	57,66	180	2,29	13,39	3,37	5,83	4,27	0,90	2,17	12,48
13	114	171	6,62	181	1394	904	5,88	14,40	2,28	4,64	4,69	122,52	2,28	
14	>900	>32000	5,32	265,20	2671	9743	28,34	135	24,21	1301	5,39	180,57	31,89	2144
15	24,53	51,09	BLD	15,80	249	8400	7,62	9,72	6,02	10,63	4,69	5,25	BLD	36,01
16	4,41	11,68	5,32	BLD	468	961	1,72	2,70	4,94	2,28	10,79	BLD	BLD	BLD
17	2,68	6,20	5,10	BLD	213	192	8,04	13,20	11,69	BLD	4,55	BLD	2,73	BLD
18	32,95	6,49	10,80	BLD	17,90	22,28	6,43	27,38	4,19	12,18	7,83	BLD	4,78	14,62
19	1,13	3,09	BLD	BLD	7,84	8,85	1,17	1,89	2,65	BLD	2,91	BLD	BLD	BLD
20	4,50	9,94	6,18	0,48	36,00	28,07	1,29	1,63	6,53	BLD	2,91	BLD	BLD	BLD
r érték	0,97		0,35		0,68		0,98		0,48		0,28		0,83	

Az esetenként gyenge erősségű összefüggéseken túl az egyes rendszerekkel mért citokinszintek között szisztémás eltérést is kimutattunk. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy az egyes rendszerek alkalmazásakor a vizsgálatot végző laboratóriumnak külön-külön meg kell határozni az egészséges egyénekre vonatkozó referenciaértéket, illetve, hogy a referenciaérték feltüntetése mellett érdemes jelezni, hogy milyen módszerrel történt a meghatározás.

5.2 Klinikai vizsgálatok

5.2.1 Citokinszintek perinatális jelentősége

5.2.1.1 Aszfixia, teljes testhűtés és citokinkinetika

Kísérleti adatok alapján az újszülöttkori posztaszfixás agykárosodásban a gyulladásnak, illetve az aktivált immunsejtek okozta idegsejt-károsodásnak központi szerepe van. Az immunaktivációt a gyulladásos citokinek, az IL-1, IL-2, IL-6, TNFα és IFNγ szintek emelkedése is jelzi, melyek a gyulladás kiváltásában és fenntartásában egyaránt közrejátszanak. A gyulladásos citokinek szintje az irodalmi adatok szerint perinatális aszfixiát követően ugrásszerűen nő. Az elhúzódó terápiás hipotermia igazoltan javítja a kimenetelt, ezért egyre elterjedtebben használják. A hipotermia idegvédő hatásának egyik eleme a szisztémás gyulladásra kifejtett gátló hatás lehet; ezt a hipotézist a szisztémás citokinszintek mérése alapján kívántuk igazolni.

A citokinszintek statisztikai elemzésekor két külön nem-parametrikus megközelítést alkalmaztunk. Elsőként az egyedi citokinszinteket úgynevezett split-plot modellben elemeztük, ami két rögzített faktort tartalmazott: a kezelést (hipo- és normotermia), illetve a posztnatális kort (6, 12, 24, és 72 óra). A betegek ebben a modellben random változóként szerepeltek.

A citokinszintek nem követtek normál eloszlást. Ezért az egyes értékeket rankokkal láttuk el, a további számítások során ezeket a rankokat használtuk. A fő hatások és a közöttük lévő kölcsönhatások szignifikancia szintjét a megfelelő F-próbákkal határoztuk meg; a 0,05 alatti p értékeket tekintettük szignifikánsnak. Ezen túl a hűtés kezdete és a 6. órában mért logaritmizált szérum citokinszintek közötti kapcsolat erősségét külön egyváltozós elemzéssel határoztuk meg.

Másik megközelítésként kiszámoltuk az egyes citokinértékek esetében a relatív hatás értékeket (REV). A relatív hatás azt jelzi, hogy egy adott csoportban egy adott időpontban mért citokinérték mekkora valószínűséggel lesz az összes csoport összes időpontjában citokinszintek középértéke felett [*Brunner,* 2002]. Az alacsony REV értékek kisebb, míg a nagy REV értékek nagyobb citokinszintre utalnak. A módszernek köszönhetően az egyidejűleg mért különböző

(gyakran extrém) citokinszintek tendenciájukban összehasonlíthatóvá válnak. A relatív hatásokat az SAS program F1_LD_F1.sas makró alkalmazásával számoltuk.

A számított REV értékeket a mért citokinek biológiai hatásai szerint csoportosítottuk. A proinflammatorikus IL-1-α, IL-1-β, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-γ és TNF-α citokinek REV értékeit, illetve az antiinflammatorikus IL-4 és IL-10 REV értékeit egyszerre elemeztük – azaz a pro- és antiinflammatorikus citokinek átlagos REV értékeit mind a két kezelési csoportban minden egyes időpontban meghatároztuk. A Th2 – Th1 arány jellemzésére az IL4/IFN γ arány REV értékeit külön elemeztük. 'Repeated measures ANOVA' tesztet alkalmaztunk a posztnatális kor és a kezelés pro- és antiinflammatorikus citokin REV értékekre, valamint az IL-4/IFN γ arány REV értékre gyakorolt hatásának a meghatározására. A $p < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tartottuk. Mivel explorátoros vizsgálatot végeztünk, nem korrigáltuk a p értéket az öszehasonlítások számára (így az első fajú hiba nominális értéke meghaladta a 0,05-t). Az elemzésből az MCP-1, EGF és VEGF szinteket kihagytuk, mivel immunmoduláns hatásuk nem definiált.

A hipotermiás, illetve a normotermiás körülmények mellett mért citokinszinteket a 7. táblázat összegzi. A méréstartományon kívül eső okok miatt a minták 94%-ában lehetett meghatározni a citokinszinteket; a hiányzó adatok megoszlása a két csoportban egyenletes volt.

Az egyes csoportokon belül a citokinszintek nagymértékű variabilitást mutattak, bár a hipotermiás csoportban 6 órás időpontban valamelyest alacsonyabbnak tűntek. A posztnatális kor szignifikáns hatást gyakorolt az IL-6, IL-8 és IL-10 szintre (5. ábra). A szérum IL-8- és IL-10-szint nagymértékben csökkent a 6. és a 72. posztnatális óra között (6. ábra). A szérum IL-10-szintek a 6. órában mért [medián (interkvartilis tartomány)] 4,25 (1,61-45,4) pg/ml értékről a 72. órára 1,6 (0 – 2,3) pg/ml szintre zuhantak a hipotermiás csoportban ($p = 0,001$), míg a normotermiás csoportban 179.3 (1,72 – 900) pg/ml értékről 1,22 (0,98 – 2,5) pg/ml-re csökkentek.

A posztnatális kor és a kezelés között az IL-6-szint esetében interakciót figyeltünk meg. A hipotermiás csoportban a szérum IL-6-szint a 6. órában alacsony volt és az első 72 órában nem is változott, míg a normotermiás gyermekeknél ugyanezen idő alatt a tizedére csökkent (6. ábra). (A szérum IL-6-szint a 6. posztnatális órában a hipotermiás csoportban 31,62 (16,30-43,03) pg/ml, a normotermiás csoportban 381,47 pg/ml (36,86-465,58) pg/ml (Mann Whitney teszt, $p = 0,017$). A hűtött csoportban a 6. órában mért szérum IL-6 szintek szignifikánsan összefüggtek a megelőző hűtés időtartamával: $r^2=0,47$, $p = 0,026$.

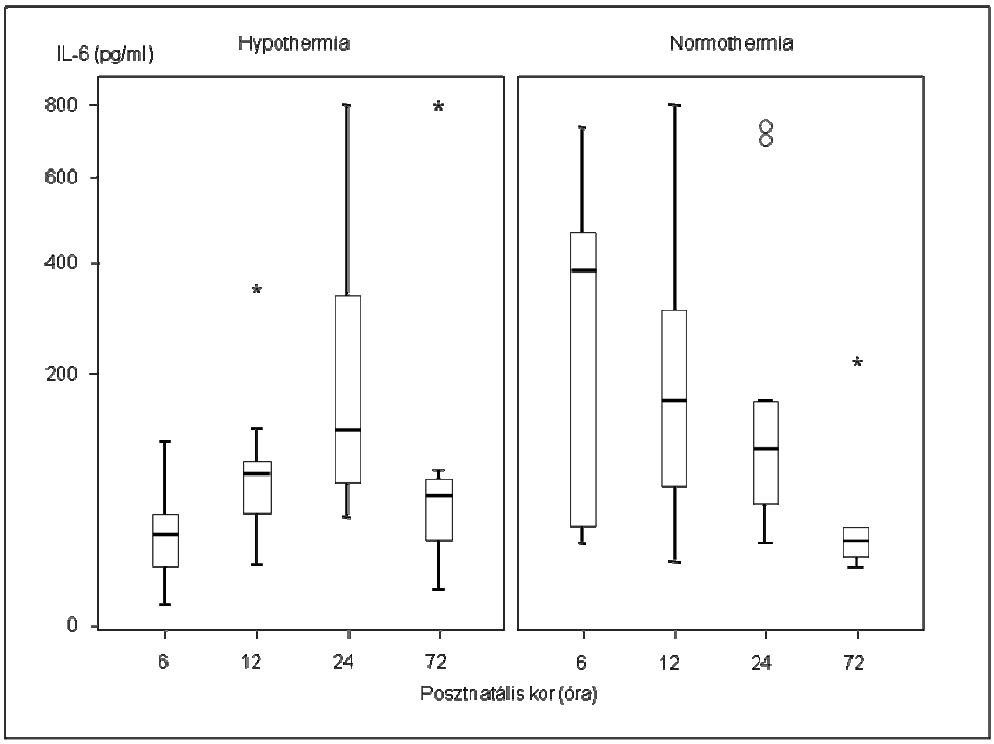
A TNF-α esetében a posztnatális kor és a kezelés között figyeltünk meg kölcsönhatást. Ennek a citokinnek a szintje a hipotermiás csoportban alacsonyabb volt a 6. órában.

A proinflammatorikus citokinszintek közös jellemzésére bevezetett REV értékek esetében a 6. és a 72. posztnatális óra között a posztnatális kor közel szignifikáns hatását észleltük ($p = 0,049$), a posztnatális kor és a hipotermia között pedig kölcsönhatást találtunk ($p = 0,049$), (7. ábra).

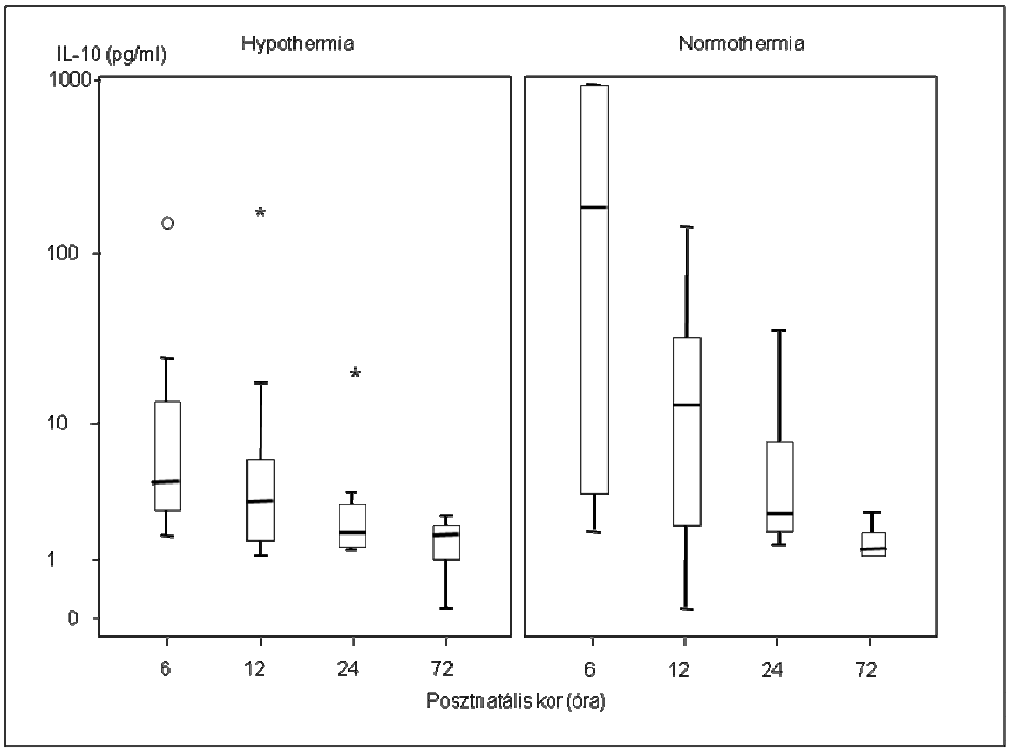
A hipotermiás kezelés esetében szignifikáns hatást találtunk az antiinflammatorikus REV értékek esetében ($p = 0,023$), ez elsősorban a hipotermiás csoportban mért alacsonyabb REV értékeknek volt köszönhető (8. ábra). Ezen túl mind a két csoportban a 6. és a 72. óra között az IL-4/IFN-γ arány REV értékei szignifikánsan emelkedtek ($p < 0.001$) (9. ábra).

7. táblázat: Citokinszintek hipotermiás és normotermiás körülmények között kezelt aszfixiás újszülötteknél a 6 – 72. posztnatális órában. BLD = kimutathatósági határ alatti érték

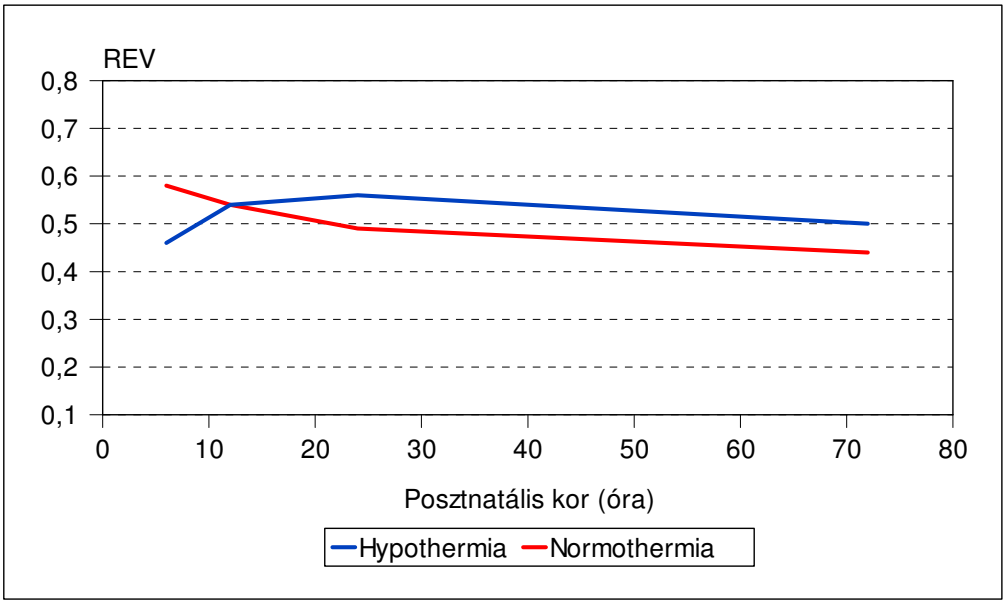
Szérum citokin	**Hipotermia**				**Normotermia**				**Kezelés hatás**	**Idő hatás**	**Kölcsön-hatás a két faktor között**
	6 óra	**12 óra**	**24 óra**	**72 óra**	**6 óra**	**12 óra**	**24 óra**	**72 óra**	**P value**		
IL-1-α (pg/ml)	0,72 [0 -1,9]	BLD [0 – 4,32]	0,34 [0 -1,26]	BLD [0 -5,75]	0,68 [0 -1,19]	BLD [0 -1,12]	BLD [0 -0,72]	0,72 [0 -1,94]	**0,75**	**0,25**	**0,96**
IL-1-β (pg/ml)	BLD [0 -8,4]	0,97 [0 – 7,96]	0,955[0 – 7,7]	BLD [0 – 22]	1,29 [0 -2,05]	1,14 [0 -1,8]	1,1 [0 -2,38]	0,83 [0 – 1,9]	**0,33**	**0,46**	**0,61**
IL-2 (pg/ml)	BLD [0 -6,9]	6,0 [0 – 10,5]	2,64 [0 -8,74]	6,0 [0 -10,3]	BLD [0 – 9]	BLD [0 – 4,9]	BLD [0 – 11]	BLD [0 -5,27]	**0,38**	**0,81**	**0,34**
IL-4 (pg/ml)	3,1 [0 – 9,6]	4,6 [2,4 – 6,9]	4,3 [0 – 6,9]	4,1 [0 – 8,5]	6,1 [2,8 -16]	4,6 [2,6 -7,2]	5,5 [3,1 -11,3]	4,2 [3,8 – 5,4]	**0,16**	**0,15**	**0,09**
IL-6 (pg/ml)	32 [3,4 – 111]	79 [16 – 342]	97 [42 -800]	59 [6,4 -800]	381 [26-735]	170 [17-800]	117 [26 -735]	30 [15 -217]	**0,23**	**0,01**	**0,01**
IL-8 (pg/ml)	447 [39 - >2900]	190 [37- >2900]	123 [25-1457]	73 [20 ->2900]	374 [41-721]	287 [81-2361]	249 [28-518]	73 [31-2487]	**0,93**	**0,01**	**0,74**
IL-10 (pg/ml)	4,3 [1,6-5,4]	2,7 [0,98 –163]	1,6 [1,12 -20]	1,6 [0 – 2,3]	179[1,7-900]	8,47 [0 -138]	3,0[1,3 -36]	1,2 [0,98-2,5]	**0,25**	**<0,0001**	**0,19**
Interf.-γ pg/ml)	7,2 [0 – 25]	10,1[0 – 111]	8,8 [3,8 –136]	8,2 [2,2 – 68]	6,4 [0 -11,7]	7,6 [0 -41,7]	6,2 [0 -53]	2,2 [0 – 6,8]	**0,28**	**0,29**	**0,46**
TNF-α (pg/ml)	6,4 [3,5- 94]	11,6 [4,9–137]	8,6 [4,5 – 29]	8,8 [5,4 – 75]	9,1 [6,6 -30]	10,1 [5,2 -4,5]	9,7 [3,7 -22]	10[6,9 – 12,5]	**0,94**	**0,89**	**0,02**



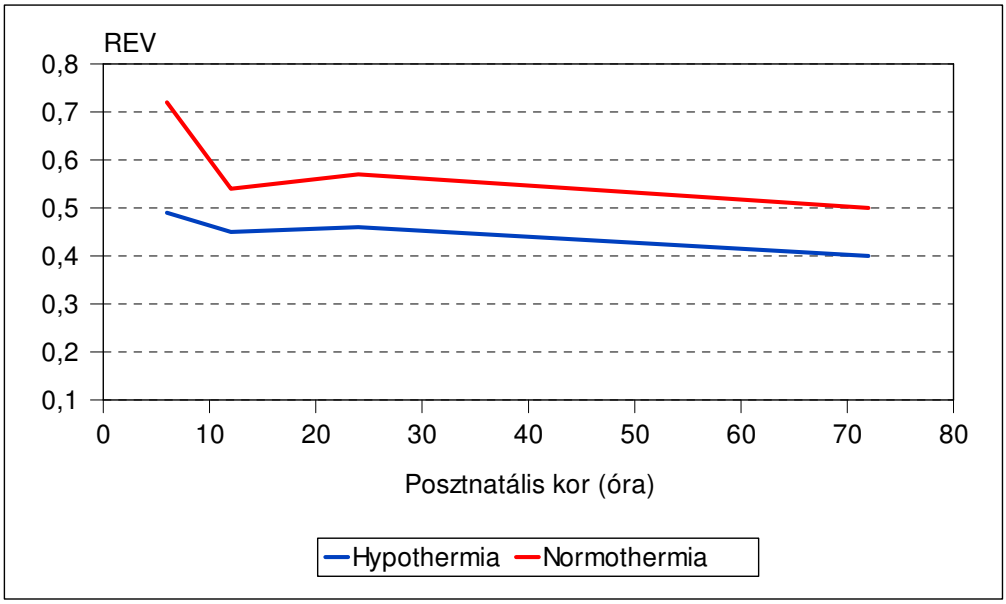
5. ábra: IL-6 szintek hipotermiában és normotermiában (medián, interkvartilis tartomány)



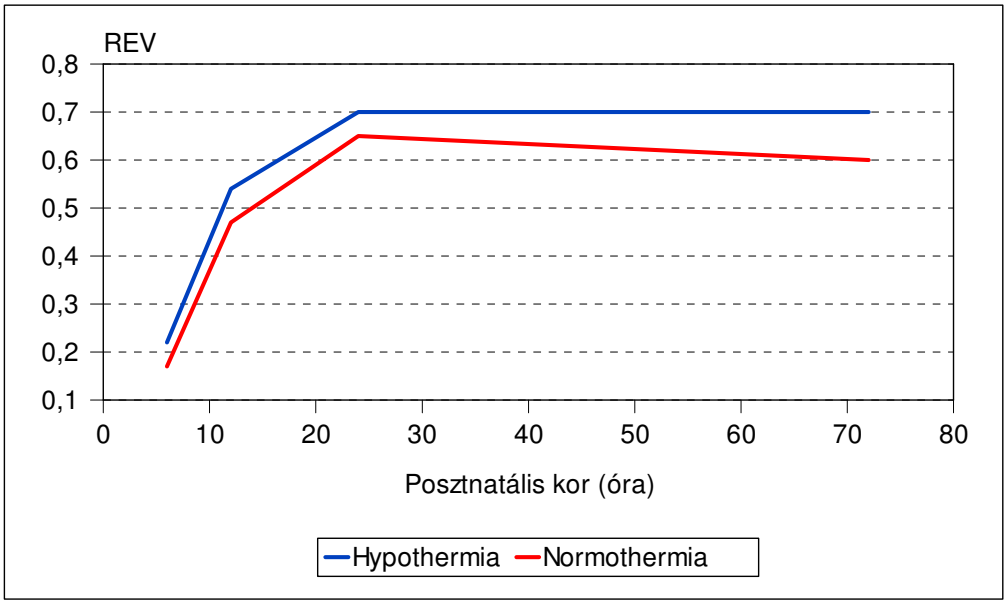
6. ábra: IL-10 szintek hipotermiában és normotermiában (medián, interkvartilis tartomány)



7. ábra: 'measures ANOVA' teszt: a posztnatális kor és a hipotermia proinflammatorikus citokin REV értékekre gyakorolt hatása. *Posztnatális kor hatása: p = 0,049; posztnatális kor és a hipotermia közötti kölcsönhatás: p = 0,049. REV = relatív effekt, részleteket lsd. a szövegben*



8. ábra: 'Repeated measures ANOVA' teszt a posztnatális kor és a hipotermia antiinflammatorikus citokinek REV értékére gyakorolt hatásának a kimutatására (*hipotermia: p < 0,001*); *részleteket lásd a szövegben*



9. ábra: 'Repeated measures ANOVA' teszt a posztnatális kor és a hipotermia IL-4/IFN γ arány REV értékeire gyakorolt hatásának a kimutatására. (kor: $p < 0{,}001$) *Részleteket lásd a szövegben*

5.2.1.2 Endogén kortizol hatása a szisztémás citokinszintekre koraszülött és újszülöttkorban

A koraszülöttek egy részében az adekvát terápia ellenére is súlyos gyulladásos szövődmények, elsősorban légzőszervi és idegrendszeri károsodások lépnek fel. E szövődmények hátterében egy közös patomechanizmus, a „magzati gyulladásos válaszreakció szindróma" (Fetal Inflammatory Response Syndrome) körvonalazódott. Ennek lényege a magzati korban az immunrendszer generalizált aktivációja. A magzati gyulladásos válaszreakció szindróma során a magzat szervezetében a proinflammatorikus citokinek, elsősorban az interleukin-6 szintjének emelkedése következik be. A gyulladásos citokinek szintjét a perinatális fertőzés alapvetően meghatározza. Emellett azonban teoretikusan számos egyéb tényező, így az alkalmazott terápia és az endokrin státusz is modulálhatja a gyulladás intenzitását. Munkánk során az endogén kortizol potenciális jelentőségére vonatkozóan gyűjtöttünk adatokat.

A koraszülötteknél mért, igen nagyfokú variabilitást mutató kortizol- és citokinszinteket a 8. táblázat összegzi. Bár tendenciájában több citokin esetében is észleltünk eltéréseket a megszületést követően, szignifikáns változást csak az emelkedő IL-10 szintek esetében mutattunk ki. Szintén kefejezett emelkedést igazoltunk a kortizolszintek esetében a születés után a 3. és a 7. napon ($p = 0{,}006$, illetve $p = 0{,}02$).

Az endogén kortizolszint egészséges referenciatartománya kora- és újszülöttkorban nagyon tág határok között változik: gyakorlatilag eddig még nem határoztak meg egy olyan cut-off értéket, ami alapján el lehetne dönteni azt, hogy egy kora- vagy újszülöttnél indokolt-e a kortizoladás. Ezért elemzésünk során azt a megközelítést választottuk, hogy a vizsgálatban résztvevő gyermekeket (aszfixiás újszülötteket, illetve koraszülötteket) a kortizolszintek középértéke alapján sztratifikáltuk 'középérték alatti', illetve 'középérték és afeletti' ('alacsony' és a 'magas' kortizolszintű) csoportokra. Az ezekben a csoportokban mért citokinszinteket a 9. és 10. táblázatok összegzik.

8. táblázat: Kissúlyú koraszülöttek citokin- és kortizolszintje az első hét életnapon. (*Adatok medián, kvartilis formában megadva; IL= interleukin, IFN= interferon, TNF=tumor nekrózis faktor*)

	0. nap	**1. nap**	**3. nap**	**7. nap**
Kortizol (pg/ml)	59,15 [13,51 – 144]	186,1 [66,98 – 186,1]	253,94 [186,1 – 694]	286 [186,1 – 533]
IFNγ (pg/ml)	22,18 [1,11 – 109,0]	22,18 [12,28 – 82,28]	1,11 [1,11 – 72,16]	1,11 [1,11 – 113]
IL-10 (pg/ml)	10,1 [3,58 – 19,0]	14,9 [8,7 – 27,6]	15,5 [8,89 – 29,6	14,5 [7,85 – 29,6]
IL-12 (pg/ml)	18,57 [5,47 – 40,4]	27,9 [16,6 – 45,5]	29,6 [16,6 – 53,2]	27,68 [16,2 – 49,6]
IL-13 (pg/ml)	1,56 [1,09 – 9,12]	1,13 [1,09 – 6,29]	1,99 [0,3 – 6,29]	2,42 [0,89 – 6,32]
IL-17 (pg/ml)	104 [42,7 – 156]	96,6 [26,5 – 137]	61,7 [4,72 – 126]	81,5 [34,6 – 125]
IL-1β (pg/ml)	5,55 [0,05 – 19,01]	10,28 [4,05 – 25,4]	8,58 [0,655 – 23,66]	10,98 [2,46 – 29,6]
IL-2 (pg/ml)	1,35 [0,16 – 15,35]	8,54 [0,16 – 20,70]	2,51 [0,16 – 15,32]	2,46 [0,16 – 15,32]
IL-4 (pg/ml)	8,98 [4,67 – 15,78]	4,67 [4,67 – 17,5]	4,67 [4,67 – 14,05]	4,67 [4,67 – 11,44]
IL-5 (pg/ml)	3,14 [1,15 – 5,75]	2,08 [1,42 – 5,75]	5,75 [2,58 – 10,78]	9,14 [5,26 – 14,06]
IL-6 (pg/ml)	14,58 [9,13 – 137]	33,89[12,5 – 89,5]	51,4 [24,26 – 96,16]	85,8 [40,2 – 150,0]
IL-7 (pg/ml)	0,65 [0,65 – 9,45]	0,65 [0,65 – 2,728]	0,65 [0,65 – 0,65]	0,65 [0,65 – 0,65]
IL-8 (pg/ml)	417,8 [96,9 – 1351]	1284 [325 – 3444]	1102 (490 – 2296)	1155 [455 – 5506]
TNFα (pg/ml)	8,53 [3,59 – 31,93]	14,51 [6,51 – 32,25]	11,13 [3,59 – 23,84]	8,53 [3,59 – 31,93]

9. táblázat: táblázat Magas endogén kortizolszintű kissúlyú koraszülöttek citokin- és kortizolszintje az első hét életnapon (*Adatok medián, kvartilis formában megadva; IL= interleukin, IFN= interferon, TNF=tumor nekrózis faktor*)

	0. nap	**1. nap**	**3. nap**	**7. nap**
Kortizol (pg/ml)	90,8 [6,49 – 134]	186,1 [53,0 – 474]	639 [268 – 942]	548 [415 – 661
IFNγ (pg/ml)	63,4 [1,11 – 113,09]	22,2 [12,28 – 97,7]	12,28 [1,11 – 113]	22,18 [1,11 – 113]
IL–10 (pg/ml)	8,60 [2,22 – 13,76]	13,22 [5,60 – 35,4]	27,8 [9,10 – 35,1]	18,10 [9,52 – 34,2]
IL–12 (pg/ml)	16,1 [0,56 – 26,6]	16,68 [13,05 – 44,3]	23,64 [16,33 – 51,3]	28,6 [15,7 – 63]
IL–13 (pg/ml)	1,99 [0,30 – 19,1]	1,99 [1,09 – 5,45]	3,85 [0,30 – 7,43]	2,85 [0,69 – 13,8]
IL–17 (pg/ml)	110,3 [44,4 – 159]	80,0 [14,4 – 142]	61,67 [10,8 – 149]	82,9 [36,2 – 148]
IL–1β (pg/ml)	3,87 [0,05 – 11,76]	9,74 [0,05 – 28,2]	7,62 [0,05 – 28,4]	10,28 [4,01 – 28,4]
IL–2 (pg/ml)	0,16 [0,16 – 7,22]	0,16 [0,16 – 33,6]	0,16 [0,16 – 12,43]	2,46 [0,16 – 15,3]
IL–4 (pg/ml)	8,98 [4,67 – 15,19]	7,35 [4,67 – 15,19]	4,67 [4,67 – 15,19]	4,67 [4,67 – 12,9]
IL–5 (pg/ml)	3,09 [1,15 – 5,75]	2,08 [1,51 – 6,02]	5,75 [1,51 – 10,04]	5,75 [1,75 – 10,04]
IL–6 (pg/ml)	14,55 [8,38 – 96,5]	25,02 [11,04 – 81,5]	53,9 [21,15 – 128]	82,4 [43,4 – 160]
IL–7 (pg/ml)	0,65 [0,65 – 1,84]	0,65 [0,65 – 1,25]	0,65 [0,65 – 0,65]	0,65 [0,65 – 0,65]
IL–8 (pg/ml)	243 [73,2 – 1905]	1735 [267 – 7342]	1120 [517 – 4463]	2397 [1321 – 6716]
TNFα (pg/ml)	3,59 [2,75 – 31,93]	8,53 [6,27 – 36,41]	15,29 [3,59 – 27,9]	8,53 [3,59 – 31,9]

10. táblázat: Alacsony endogén kortizolszintű kissúlyú koraszülöttek citokin- és kortizolszintje az első hét életnapon (*Adatok medián, kvartilis formában megadva; IL= interleukin, IFN= interferon, TNF=tumor nekrózis faktor*)

	0. nap	**1. nap**	**3. nap**	**7. nap**
Kortizol (pg/ml)	40,5 [23,7 – 148]	10,5 [8,92 – 10,5]	10,5 [10,5 – 11,5]	12,7 [10,5 – 18,3]
IFNγ (pg/ml)	123 [1,11 – 54,6]	22,2 [12,3 – 54,6]	1,11 [1,11 – 22,2]	1,11 [1,11 – 54,6]
IL–10 (pg/ml)	14,3 [7,24 – 24,4]	17,8 [13,.0 – 24,4]	13,2 [8,89 – 27,8]	11,3 [5,83 – 27,8]
IL–12 (pg/ml)	29,6 [10,9 – 50,3]	40,7 [25,8 – 45,5]	29,6 [18,5 – 52,7]	26,8 [18,5 – 35,9]
IL–13 (pg/ml)	1,13 [1,09 – 3,85]	1,13 [1,09 – 6,29]	1,13 [1,09 – 3,85]	1,99 [1,09 – 6,29]
IL–17 (pg/ml)	96,6 [42,7 – 131]	96,6 [29,7 – 132]	61,7 [4,72 – 115]	80,0 [36,2 – 115]
IL–1β (pg/ml)	8,07 [4,05 – 28,4]	10,8 [5,58 – 24,5]	10,9 [4,55 – 16,2]	12,6 [2,33 – 37,4]
IL–2 (pg/ml)	8,07 [0,16 – 21,7]	11,5 [0,16 – 19,4]	4,06 [0,16 – 15,3]	1,91 [0,16 – 17,1]
IL–4 (pg/ml)	8,98 [4,67 – 17,5]	4,67 [4,67 – 17,5]	4,67 [4,67 – 12,9]	4,67 [4,67 – 9,23]
IL–5 (pg/ml)	3,18 [1,15 – 5,75]	2,08 [1,42 – 4,78]	5,75 [2,58 – 13,0]	10,5 [6,85 – 16,1]
IL–6 (pg/ml)	14,6 [9,54 – 139]	40,8 [15,6 – 90,1]	48,3 [25,0 – 77,0]	96,2 [34,2 – 140]
IL–7 (pg/ml)	0,65 [0,65 – 9,45]	0,65 [0,65 – 5,39]	0,65 [0,65 – 0,65]	0,65 [0,65 – 0,65]
IL–8 (pg/ml)	519 [144 – 1222]	1238 [331 – 2637]	1084 [415 – 1732]	597 [298 – 1058]
TNFα (pg/ml)	13,7 [6,51 – 31,9]	15,3 [6,51 – 23,8]	8,53 [6,51 – 15,3]	8,53 [6,51 – 31,9]

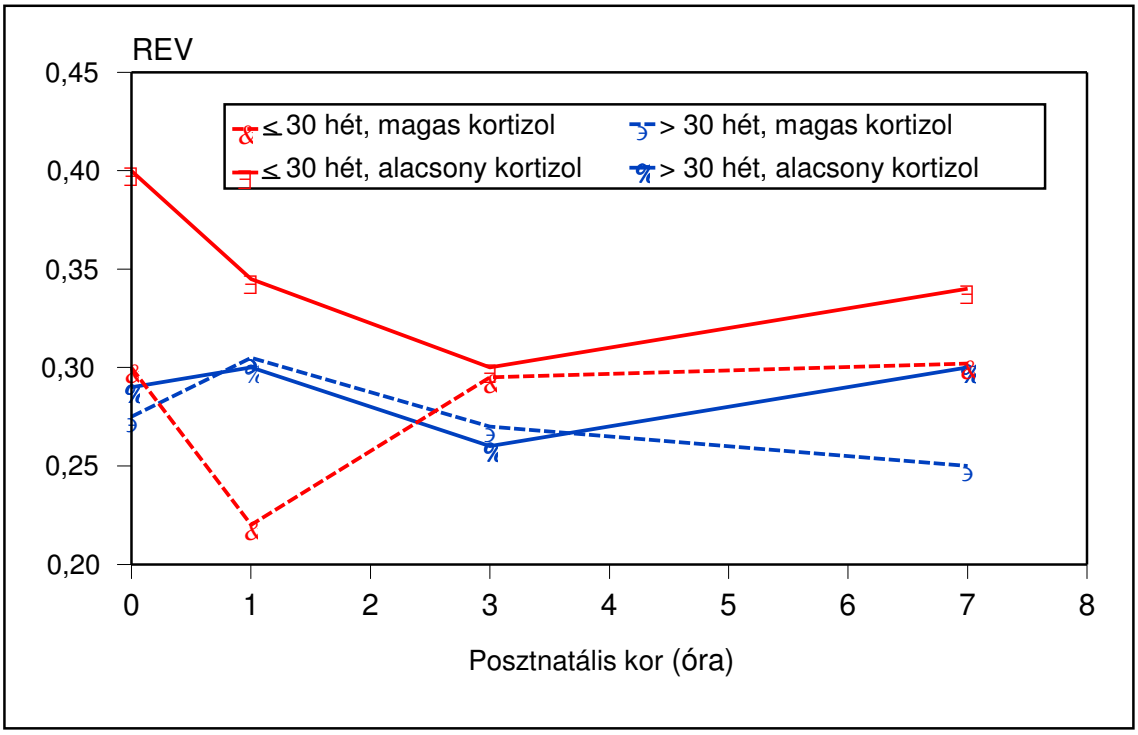
Az ’alacsony’ és a ’magas’ kortizolszintű csoportok kialakítása a 0, 1, 3. és 7. napon mért kortizolszintek medián értékei alapján történt. Az adott napon mért értékek mediánja feletti értékek esetén a gyermek ’1’, egyébként ’0’ értéket kapott. A négy mérési napon így kialakított értékeket összegeztük; ennek alapján alacsony kortizolszintű csoportba soroltuk a 0, 1; míg a magas kortizolszintű csoportba soroltuk a 3 és a 4 összpontszámú gyermekeket. Amennyiben az összpontszám 2 volt, a hetedik napi kortizolszint határozta meg, hogy melyik csoportba kerül a gyermek. Az ’alacsony’ és a ’magas’ kortizolszintű gyermekeknél mért citokinszinteket a 9. és 10. táblázat mutatja. Non-parametrikus teszttel vizsgálva az egyes citokinek esetében nem észleltünk szignifikáns különbséget egyik napon sem.

Annak érdekében, hogy a biológiai hatás alapján csoportosított citokinekre kifejtett kortizolhatást tesztelhessük, az 5.2.1.1.1. pontban bemutatott eljárást alkalmaztuk, azaz a citokineket biológiai hatás szerint csoportosítottuk és úgy határoztuk meg a REV értékek, valamint a kortizolszintek közötti interakciót.

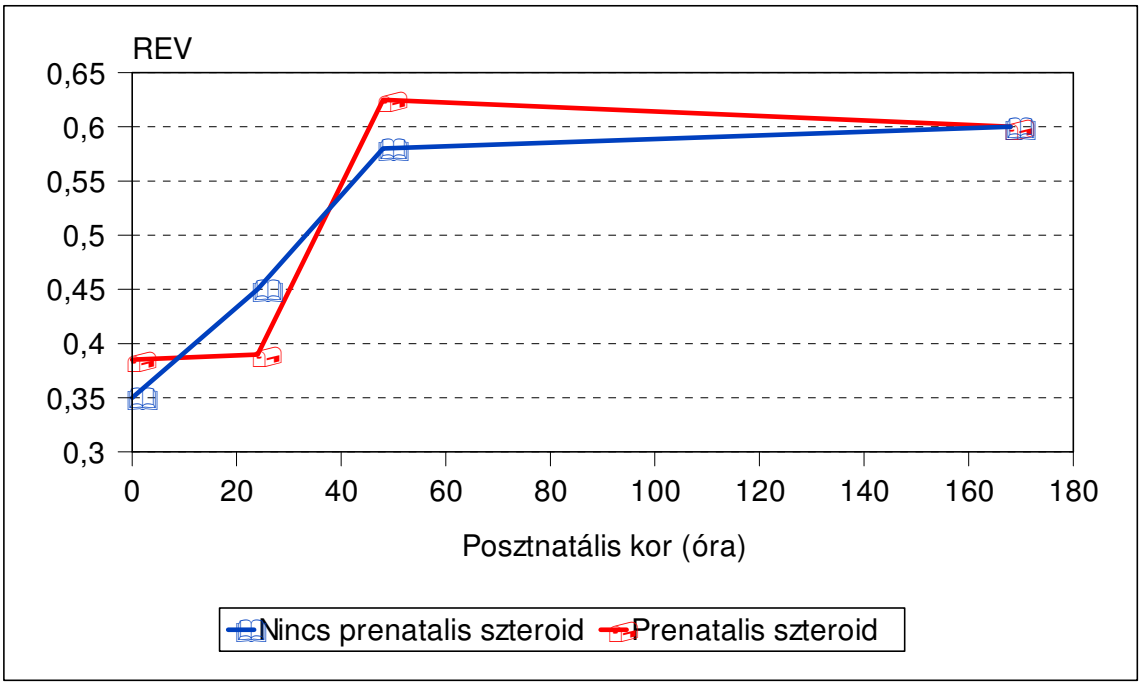
Mivel a koraszülöttek rendkívül heterogén csoportot alkotnak, a kortizol citokin REV értékekre gyakorolt hatását az érettebb (31 – 33. gesztációs hétre született), illetve az éretlenebb (legfeljebb 30. gesztációs hétre született) gyermekek esetében külön-külön értékeltük (10. ábra). Kimutattuk, hogy endogén kortizolszintek mellett a proinflammatorikus citokinek esetében magasabbak a REV-értékek ($p < 0{,}0001$). A hatás az alacsonyabb gesztációs korú gyermekeknél még kifejezettebb volt.

Az endogén kortizolszintet számos tényező, pl. stressz, mellékvese érettsége stb. mellett a terápia is befolyásolhatja. Ebből a szempontból az egyik legfontosabb faktor az anyának a szülés megkezdése előtt a magzat tüdőérésének a gyorsítása érdekében szülés előtt adott szteroid lehet. Az általunk vizsgált populációban azonban a kortizolértékekre csak a posztnatális kor gyakorolt hatást, a prenatális szteroidadás nem (11. ábra).

Az endogén kortizol és az antiinflammatorikus citokinszintek esetében nem találtunk kapcsolatot.

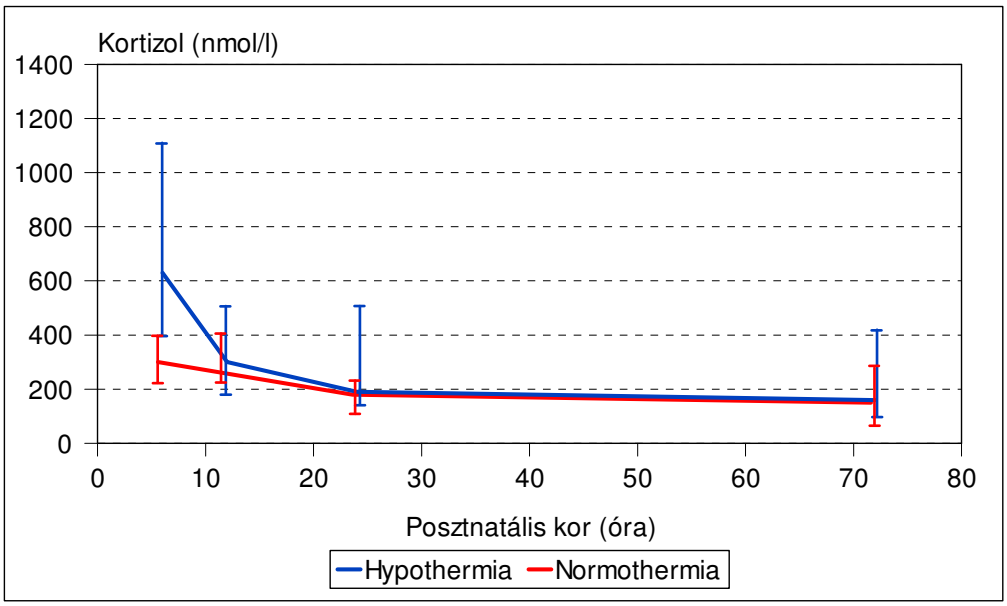


10. ábra: Koraszülöttek proinflammatorikus citokinszintjeinek endogén kortizoltól, érettségtől és posztnatális kortól való függése, REV értékekre gyakorolt hatások: éretlenség p = 0,003, posznatális kor p = 0,035, kortizolszint, p = <0,0001



11. ábra: Koraszülötteknél a kortizolszintekre (REV értékekre) a prenatális szteroidadás nem gyakorol hatást (p = 0,97), csak a posztnatális kor (p < 0,0001)

A citokinek és az endogén kortizolszintek közötti kapcsolatot az 5.2.1.1. részben tárgyalt aszfixiás újszülöttek esetében is vizsgáltuk. Kiderült, hogy az aszfixiás újszülöttek esetében a kortizolszintek – szemben a koraszülöttekkel – az életkor előrehaladtával folyamatosan csökkennek ($p = 0{,}001$) (12. ábra), azonban a hipotermiás kezelés nem befolyásolja a kortizolszinteket.



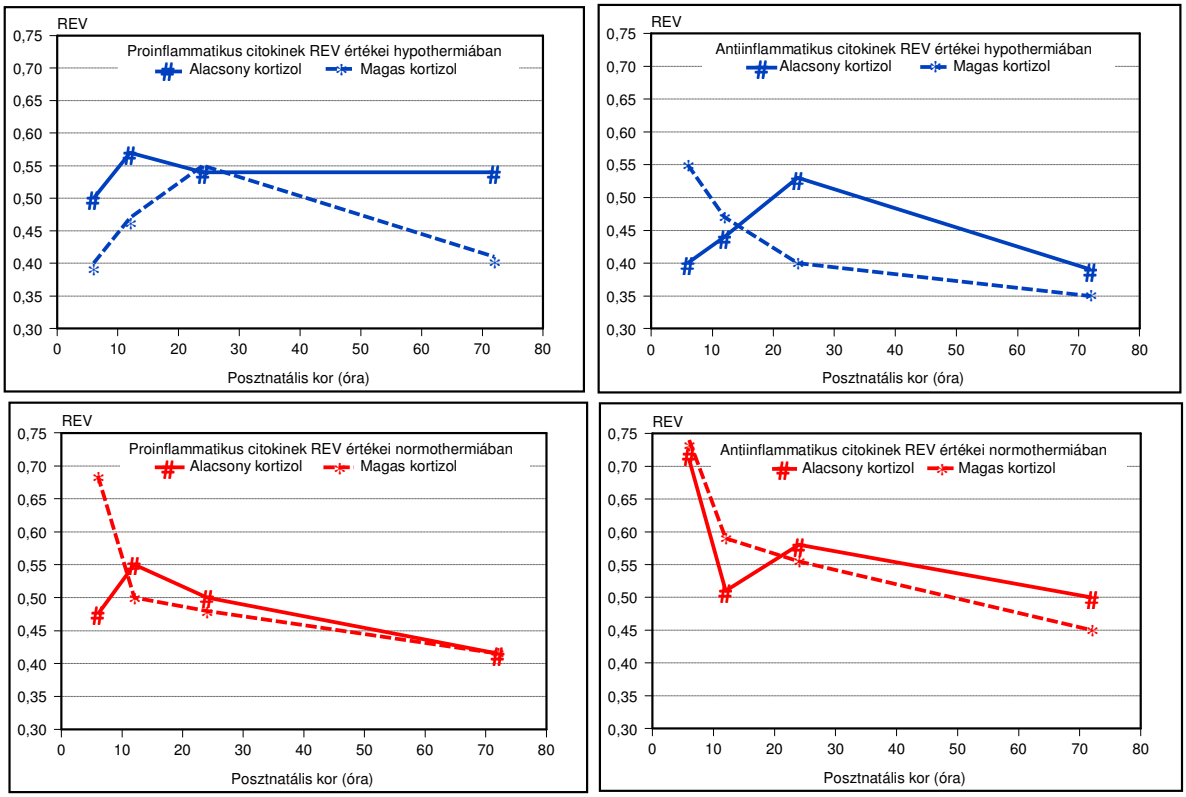
12. ábra: Kortizolszintek a hipotermiás és normotermiás csoportokban a posztnatális kor függvényében

Ezt követően ezt a populációt is 'alacsony' és 'magas' kortizolszintű csoportokra osztottuk, a koraszülöttek esetében bemutatott módszerrel. Az 5.2.1.1 részben ismertetett módon elemeztük, hogy a magas vagy alacsony kortizolszint hogyan hat az egyes citokinek REV értékére, illetve a hatások alapján összesített pro- és antiinflammatorikus REV értékekre.

Elemzésünk azt mutatta, hogy a hipotermiás és a normotermiás kezelés, valamint a posztnatális kor mellett az endogén kortizolszint is számos citokinszintre hatást gyakorol (lásd 11. táblázat). A pro- és antiinflammatorikus citokinek REV értékeinek összesítése alapján együttesen is vizsgáltuk összességükben ezekre milyen hatást gyakorol a kortizolszint. Kimutattuk, hogy a hipotermiás csoportban alacsony kortizolszinttel rendelkező koraszülöttekben lényegesen magasabb a proinflammatorikus citokinek szintje, míg az antiinflammatorikusaké alacsonyabb, mint magasabb kortizolszintekkel rendelkezőké. Normotermiás csoportban lényegében nem észleltünk különbséget az alacsonyabb és a magasabb kortizolszintű gyermekek között. Eredményeinket a 13. ábra összegzi.

11. táblázat: A kortizol, a hipotermiás kezelés és a posztnatális kor, illetve ezek interakciójának az egyes citokinekre gyakorolt hatása és szignifikanciaszintje. (*IL = interleukin, IFN = interferon, TNF= tumor nekrózis faktor*)

	Kortizol	**hipotermia**	**posztnatális kor**	**Kortizol X idő**	**Kortizol X hipotermia**	**Hipotermia X posztnatális kor**
IFN-γ	0,56	0,34	0,21	0,03	0,91	0,49
IL-10	0,08	0,25	<0,0001	0,01	0,61	0,08
IL-1α	0,23	0,90	0,26	0,61	0,06	0,97
IL-1β	0,88	0,26	0,49	0,09	0,38	0,44
IL-2	<0,0001	0,32	0,68	0,41	0,85	0,27
IL-4	0,11	0,16	0,08	0,21	0,62	0,05
IL-6	0,70	0,24	0,004	0,16	0,78	0,003
IL-8	0,13	0,76	0,01	0,46	0,08	0,75
TNF—α	0,14	0,98	0,95	0,35	0,93	0,01
VEGF	0,08	0,16	<0,0001	0,27	0,86	0,02
IL-4 / IFN—γ	0,62	0,01	0,22	0,01	0,75	0,38
IL-10 / IL-6	<0,0001	0,25	<0,0001	0,01	0,24	0,69
IL-10 / IL-2	<0,0001	0,07	<0,0001	0,30	0,58	0,25



13. ábra: A kortizol, a hipotermiás kezelés és a posztnatális kor, illetve ezek interakciójának az egyes citokinekre gyakorolt hatása és szignifikanciaszintje. (*IL = interleukin, IFN = interferon, TNF= tumor nekrózis faktor*)

5.2.1.3 Perinatális szepszis és citokinprofil

Kora- és újszülöttkorban a szisztémás bakteriális fertőzés sokszor igen rapid lefolyású, ezért a gyors diagnózis alapvetően fontos a hatékony terápia mielőbbi bevezetése és a súlyos szövődmények megelőzése érdekében. A diagnózis felállítását a bakteriális gyorstesztek és a hemokultúra mellett az akut fázis fehérjék szintjének, elsősorban a magasabb CRP, IL-6 és prokalcitonin szint kimutatása segíti; ezek monitorozása támpontot ad abban is, hogy a terápia mennyire hatásos. Munkánk során elemeztük, a biochip módszer segítségével meghatározott citokinszintek adnak-e járulékos információt szeptikus újszülötteknél a prokalcitonin- és CRP-szintek mellett.

A vizsgált populációban mért értékeket 12. táblázat összegzi.

A perinatális szepszis diagnózisa során cut-off értékként alkalmazott 20 mg/l CRP értéket, illetve 10 µg/l prokalcitonin szintet meghaladó értéket 6, illetve 26 gyermeknél mértünk. Csupán 6, illetve 15 gyermek esetében haladta meg az IL-6, illetve IL-8-szint irodalom szerint a szepszisre jellemző 80 pg/ml-s, illetve 90 pg/ml-s cut-off értéket [*Kruegera,* 2001]. Minden, a prokalcitonin és/vagy a CRP szint alapján szeptikus betegnél magasabb volt az IL-6-szint. Az

emelkedett IL-8-at mutató 15 gyermek közül 6-nál az egészséges referenciatartományon belül volt a prokalcitonin és CRP szintje; azaz az első napon 90 pg/ml feletti IL-8 és/vagy 2,5 μg/l feletti prokalcitonin és/vagy 3 mg/l feletti CRP-szint a perinatális szepszis tüneteit mutató újszülöttek 95%-nál jelen volt. Az IL-10 esetében perinatális szepszis kimutatására javasolt 40 pg/ml cut-off értéket [*Bender,* 2008] meghaladó szintet egyetlen gyermeknél sem mutattunk ki. A betegek mindegyikénél a születést követően azonnal antibiotikus kezelést indítottak. Emellett a prokalcitonin-értékek az 1. életnap és a 2. életnap között közel szignifikánsan (p = 0,07), míg a 2. és 3. nap között szignifikánsan (p = 0,026); a CRP-szint a 2. és 3. nap között szignifikánsan (p = 0,003) csökkentek. A vizsgált citokinek esetében szignifikáns változást az egyes napok között nem észleltünk.

12. táblázat: Veleszületett szepszisben az első három életnapon mért prokalcitonin-, CRP- és citokinszintek, valamint fehérvérsejt-számok (*medián, kvartilisek*)

Szérum citokinek	**Antibiotikum adása előtt (1. életnap)**	**Antibiotikus kezelés alatti 1. nap (2. életnap)**	**Antibiotikus kezelés alatti 2. nap (3. életnap)**
IL-6 (pg/ml)	11,2 (5,54 – 29,27)	8,2 (3,47 – 14,025)	4,3 (2,4 – 6,9)
IL-8 (pg/ml)	66,16 (38,72 – 162,9)	50,34 (17,08 – 101,27)	52,26 (32,19 – 123,5)
IL-10 (pg/ml)	3,555 (2,3 – 5,5)	2,945 (1,968 – 3,922)	2,165 (1,715 – 3,15)
Prokalcitonin-szint (μg/l)	15,56 (8,24 – 28,34)	1,535 (0,688 – 7,858)	0,35 (0,215 – 0,665)
CRP-szint (mg/l)	2,5 (0,675 – 9,4)	1,7 (0,6 – 9,7)	0,7 (0,1 – 4,625)
Fehérvérsejtszám (G/l)	15,7 (10,725 – 22,95)	10,75 (9 – 14,35)	12 (9,7 – 15,7)

Az egyes életnapokon elemeztük a vizsgált citokinek, CRP- és prokalcitoninszintek, valamint fehérvérsejt-számok közötti kapcsolatot (13. táblázat). Néhány időpontban egy-egy analitot leszámítva nem mutattunk ki szignifikáns kapcsolatot a vizsgált paraméterek között. A szignifikáns kapcsolatokat a táblázatban jelöltem.

13. táblázat: A mért gyulladásos citokinek (pg/ml), CRP (mg/l) és PCT (µg/l), valamint a FVS (G/l) közötti kapcsolat erőssége (r értékek) szeptikus kora- és újszülötteknél az antibiotikus kezelés megkezdése előtt (1. nap), majd után (2. és 3. nap). területek szignifikáns ($p < 0,05$) erősségű kapcsolatot jelentenek, n = 41 szeptikus újszülött adatai alapján. *(IL = interleukin, PCT = prokalcitonin, CRP = C reaktív protein, FVS=fehérvérsejtszám)*

1.nap					
	IL-8	**IL-10**	**PCT**	**CRP**	**FVS**
IL-6	0,022	0,348	0,056	0,000	0,194
IL-8		0,131	0,042	0,129	0,002
IL-10			0,024	0,096	0,070
PCT				0,643	0,432
CRP					0,271
2.nap					
	IL-8	**IL-10**	**PCT**	**CRP**	**FVS**
IL-6	0,270	0,597	0,882	0,707	0,071
IL-8		0,185	0,219	0,112	0,173
IL-10			0,695	0,395	0,230
PCT				0,239	0,191
CRP					0,103
3.nap					
	IL-8	**IL-10**	**PCT**	**CRP**	**FVS**
IL-6	0,042	0,384	0,010	0,028	0,206
IL-8		0,499	0,004	0,071	0,162
IL-10			0,046	0,056	0,536
PCT				0,322	0,233
CRP					0,101

5.2.2 Citokinek májbetegségekben. A fémion-koncentrációk összefüggése a szisztémás citokinszintekkel

5.2.2.1 A vörösborfogyasztás hatása a citokinszintekre

Számos adat utal arra, hogy a nők érzékenyebbek az alkohol májtoxikus hatásaira. Nőknél már napi 20 gramm, míg férfiaknál csak napi 30 gramm alkohol krónikus fogyasztása mellett alakul ki májkárosodás. A nemtől függő különbségre számos magyarázat született, így például az, hogy nőknél az alkohol farmakokinetikája, eliminációs sebessége, szöveti eloszlása eltérő, más a metabolizmusért felelős enzimek aktivitása, fokozottabb a májsejtek érzékenysége az alkohol által kiváltott gyulladásos ingerekre. Számos kísérleti adat és klinikai megfigyelés utal arra is, hogy a májkárosodás kialakulásában a szabad gyökök által kiváltott toxikus hatásokkal, így a szabad gyök indukálta gyulladással szembeni nemtől függő érzékenység is szerepet játszik. Munkánk során a mérsékelt vörösborfogyasztás szisztémás gyulladásra, a nyomelemek szintjére és a redox-homeosztázisra gyakorolt hatásait vizsgáltuk egészséges férfiakban és nőkben.

A vizsgálat kezdetekor (baseline value, BV) és végén (end value, EV) a májfunkciós vizsgálatok eredményei egyaránt az egészséges referenciatartományban mozogtak (14. táblázat).

A vizsgálat kezdetekor a citokinszintek a férfiak és nők között nem különböztek. Nőknél az egy hónapig tartó vörösborfogyasztást követően az IL1α és az IL2 citokinek, valamint a VEGF szintje nőtt, míg az IL6 szintje csökkent. Férfiaknál szignifikáns változást a vizsgálat során nem észleltünk egyik citokin esetében sem.(15. táblázat)

A vizsgálat kezdetén és végén mért fémion-szinteket az 17. táblázat összegzi. Érdekes módon bizonyos fémionok (Zn, Pb) szintje és a Zn/Cu arány nőknél a vizsgálat kezdetekor magasabb volt, mint férfiaknál. A nemtől való függés a vizsgálat során bekövetkező változásokban is megjelent. Nőknél az EV mért vörösvértest Ca, Mg, Pb, Sr és Zn szintek, valamint a Zn/Cu arány a vizsgálat végén mérve kisebb volt, mint a vizsgálat kezdetekor. Ezzel szemben férfiaknál az Al, Ca, Li, Pb és Sr szintek csökkentekA fémionváltozással egyidejűleg az antioxidáns védelemben is észleltünk eltéréseket. Nemtől függően különbözött a kiinduláskor mért TSC és HDON paraméter is. Nőknél a HDON paraméter és a plazma redukálóképessége fokozódott, míg a plazma és vörösvértestek szabadgyök-generáló képességét tükröző TSC csökkent ($p<0,001$) vörösborfogyasztást követően. Férfiaknál a HDON és a redukálóképesség egyaránt nőtt, míg csak a plazma TSC csökkent (14 ábra). A citokinszintek, a redox-rendszer és a fémionok között számos összefüggést mutattunk ki (17. táblázat).

14. táblázat: Májfunkciós vizsgálatok eredménye a vizsgálat kezdetekor, majd egy hónapig tartó mérsékelt vörösborfogyasztást követően

Paraméterek	Nők		Férfiak	
	Vizsgálat kezdete	**Vizsgálat vége**	**Vizsgálat kezdete**	**Vizsgálat vége**
Össz-bilirubin (μmol/l)	9,84 ± 3,22	10,1 ± 2,95	10,2 ± 2,17	10,0 ± 2,72
Szérum aszpartát-aminotranszferáz (U/L)	20,6 ± 1,80	21,2 ± 1,89	23,9 ± 5,13	23,0 ± 4,83
Szérum alanin-aminotranszferáz (U/L)	12,9 ± 2,51	12,5 ± 1,92	22,1 ± 9,27†	21,9 ± 8,79
Szérum γ-glutamiltranszferáz (U/L)	14,9 ± 2,95	15,4 ± 2,80	23,7 ± 8,94†	23,2 ± 8,38

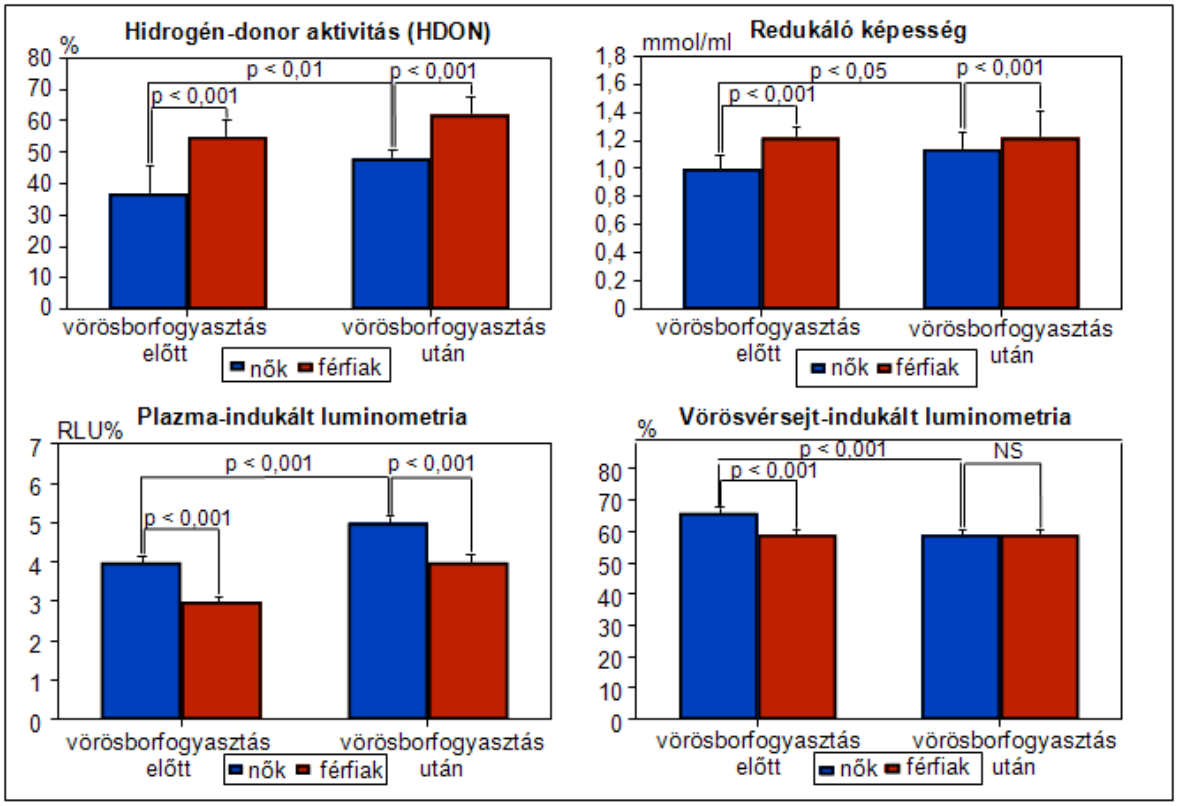
15. táblázat: Citokinszintek a vizsgálat kezdetekor, majd egy hónapig tartó mérsékelt vörösborfogyasztást követően (*IL = interleukin, IFN = interferon, TNF = tumor nekrózis faktor*)

Szérum citokin	**Nők**		**Férfiak**	
(pg/ml)	**Vizsgálat kezdete**	**Vizsgálat vége**	**Vizsgálat kezdete**	**Vizsgálat vége**
IFN-γ	1,5 [0,0 – 3,9]	2,0 [0,0 – 6,0]	2,2 [0,0 – 4,7]	2,0 [0,0 – 4,4]
IL-10	0,8 [0,0 – 1,7]	0,7 [0,0 – 1,2]	1,4 [0,0 – 2,3]	1,1 [0,0 – 3,0]
IL- 1α	0,4 [0,0 – 0,8]	0,9 [0,5 – 1,3]**	0,9[0,0 – 1,8]	0,8 [0,0 – 1,7]
IL- 1β	1,7 [0,0 – 4,3]	1,0 [0,0 – 2,3]	1,7 [0,0 – 4,5]	0,7 [0,0 – 2,0]
IL- 2	4,8 [0,0 – 9,8]	7,8 [5,6- 12,2]*	4,4 [0,0 – 6,9]	5,4 [0,0 – 7,8]
IL- 4	4,3 [2,1 – 7,0]	3,8 [2,1 – 6,8]	4,4 [2,4 – 8,5]	3,3 [0,0 – 6,6]
IL- 6	1,7 [0,6 – 4,8]	1,2 [0,0 – 3,7]*	1,0 [0,0 – 1,7]	1,1 [0,0 – 4,6]
IL- 8	21,1 [7,5 – 30,6]	20,0 [7,1 – 31,8]	22,1 [9,4 – 35,0]	13,7 [5,5 – 24,0]
TNF-α	10,3 [4,9 – 20,8]	9,9 [7,5 – 14,2]	8,1 [4,9 – 10,2]	12,1 [5,5 – 30,0]
VEGF	110 [24 – 245]	185 [46 – 320]*	272 [82 – 681]	244 [75 – 582]

** $p<0,01$ * $p<0,05$

16. táblázat: Egy hónapig tartó mérsékelt (nőknél 0,2 l/nap, férfiaknál 0,3 l/nap mennyiségű) vörösborfogyasztás hatása a vörösvértestekben mért fémionszintekekre * szignifikáns különbség a vizsgálat végén (EV) és a vizsgálat kezdetekor (BV) mért érték között, p<0,05. *Az adatokat átlag, szórás formában tüntettem fel*

	Nők		**Férfiak**	
	Vizsgálat kezdete	**Vizsgálat vége**	**Vizsgálat kezdete**	**Vizsgálat vége**
Al(μg/ml)	0,641 ± 0,305	0,526 ± 0,145	0,693 ± 0,207	0,415 ± 0,093*
Ba(μg/ml)	0,601 ± 0,140	0,617 ± 0,115	0,647 ± 0,086	0,579 ± 0,102
Ca(μg/ml)	4,170 ± 1,160	1,71 ± 0,377*	3,540 ± 0,890	1,580 ± 0,510*
Cu(μg/ml)	0,086 ± 0,037	0,082 ± 0,039	0,084 ± 0,037	0,075 ± 0,033
Fe(μg/ml)	26,610 ± 5,48	25,670 ± 4,700	27,890 ± 3,340	26,360 ± 4,310
Li(μg/ml)	0,177 ± 0,046	0,163 ± 0,041	0,178 ± 0,030	0,141 ± 0,023*
Mg(μg/ml)	1,798 ± 0,204	1,352 ± 0,170*	1,825 ± 0,278	1,588 ± 0,261
Mn(μg/ml)	0,015 ± 0,007	0,041 ± 0,081	0,015 ± 0,006	0,012 ± 0,003
P(μg/ml)	19,050 ± 4,950	19,040 ± 4,540	19,350 ± 4,470	18,900 ± 3,840
Pb(μg/ml)	**0,297 ± 0,113**	0,103 ± 0,015*	**0,124 ± 0,044**†	0,094 ± 0,012*
S(μg/ml)	54,850 ± 9,930	54,230 ± 8,600	56,780 ± 8,280	58,310 ± 6,670
Se(μg/ml)	0,013 ± 0,004	0,0120 ± 0,0017	0,018 ± 0,014	0,021 ± 0,012
Sr(μg/ml)	0,042 ± 0,014	0,031 ± 0,004*	0,040 ± 0,005	0,029 ± 0,004*
Zn(μg/ml)	**0,582 ± 0,094**	0,404 ± 0,050*	**0,377 ± 0,127**†	0,358 ± 0,066
Zn/Cu arány	6,767 ± 0,068	4,926 ± 0,099*	4,489 ± 0,124	4,773 ± 0,099



14. ábra: Egy hónapig tartó mérsékelt vörösborfogyasztás hatása az antioxidáns paraméterekre nőknél és férfiaknál

17. táblázat: Kapcsolat a fémionok, antioxidáns paraméterek és citokinszintek között (r és p értékek) (*red = redukáló képesség (%), HDON = hidrogén donor aktivitás (mmol/ml), vvtTSC = vörösvértest totál scavenger kapacitás (RLU%), pl.TSC = plazma totál scavenger kapacitás (RLU%); IL = interleukin (pg/ml), IFN = interferon (pg/ml))* A szoros korrelációt szürke színnel jelöltem

Vizsgálat előtt

Citokin – Fémion		r	P
IL-1α	Ba	0,636	0,015
IL-1 α	Fe	0,559	0,038
IL-1α	K	0,545	0,044
IL-1α	Mg	0,711	0,004
IL-1α	P	0,545	0,044
IL-1α	S	0,587	0,027
IL-2	Pb	0,456	0,038
IL-6	Mg	0,516	0,017
IL-6	S	0,446	0,042
IFNγ	Cu	0,594	0,032
IFNγ	LI	0,587	0,035

Citokin – Redox		r	P
IL-1α	red.	0,748	0,002
IL-4	red.	0,473	0,030
IL-6	red.	0,459	0,036
IL-8	SH	0,552	0,009

Fémion – Redox		r	P
Sr	red.	0,444	0,044

Vizsgálat után

Citokin – Fémion		r	P
IL-4	Al	0,475	0,046
IL-4	Cu	0,475	0,046
IL-4	Fe	0,472	0,048
IL-8	Ba	0,549	0,012
IL-8	P	0,469	0,037
IL-10	Mg	0,561	0,046

Citokin – Redox		r	P
IL-6	HDON	0,511	0,043
IL-6	SH	0,601	0,014
IL-1α	HDON	0,522	0,046
IL-1β	pl.TSC	0,666	0,036

Fémion – Redox		r	P
Al	HDON	0,452	0,040
Ba	HDON	0,574	0,006
Fe	HDON	0,471	0,031
K	HDON	0,486	0,026
P	HDON	0,571	0,007
Sr	HDON	0,567	0,007
Ba	red.	0,596	0,004
Mg	red.	0,545	0,011
P	red.	0,584	0,005
S	red.	0,475	0,029
Sr	red.	0,538	0,012
Cu	vvtTSC	0,486	0,030
P	vvtTSC	0,457	0,043

5.2.2.2 Citokinprofil és májcirrhosis

A májfibrózis és májcirrhosis ugyanannak a kórfolyamatnak a különböző állomásai. A májfibrózis esetén a máj kötőszövetesen átépül; ebben a folyamatban a gyulladás, a májsejtek károsodása, pusztulása egyidőben van jelen. A gyulladás kialakulásában és fenntartásában a gyulladásos citokinek fokozott termelődése központi szerepet játszik. Vizsgálatsorozatunk kapcsán azt vizsgáltuk, hogy a májcirrhosis hátterében álló ok hogyan befolyásolja a beteg citokinprofilját.

Különböző etiopatogenezisű májcirrhosisban szenvedő betegek esetében vizsgált citokinek szintjét az 18. táblázat összegzi. Cirrhosis minden típusában a májban termelődő akut fázis fehérjeként nyilvántartott IL-6 szintje markánsan emelkedik. Ezen túl azonban a primer biliáris cirrhosisban, illetve a HCV-fertőzés talaján, illetve a krónikus alkoholfogyasztás miatt kialakuló cirrhosis esetén észlelt citokinprofilok egymástól is lényegesen különböztek. HCV-fertőzés esetén az IL-2-szintek, míg primer biliáris cirrhosisban proinflammatorikus IL-8, illetve a TNFα szintje haladta meg az egészséges referenciacsoportban észlelt koncentrációt; az antiinflammatorikus IL-10 citokin szintje viszont primer biliáris cirrhosisban volt alacsonyabb.

18. táblázat: Citokinszintek különböző eredetű cirrhosisban szenvedő betegeknél (*IL = interleukin, IFN = interferon, TNF = tumor nekrózis faktor*)

Citokinek (pg/ml)	**Egészséges referenciacsoport**	**Alkoholos cirrhosis**	**Primer biliáris cirrhosis**	**HCV-fertőzés**
	n = 26	n = 36	n = 35	n = 14
IFNγ	1,78 [0,0 – 3,94]	2,18 [1,62 – 4,74]	2,05 [0,0 – 7,14]	1,60 [0,0 – 3,48]
IL-10	1,08 [0,0 – 2,07]	1,20 [0,12 – 2,71]	0,47 [0,0 – 3,32]*	1,08 [0,42 – 2,86]
IL-1α	0,64 [0,0 – 1,34]	0,62 [0,0 – 1,41]	0,25 [0,0 – 2,03]	0,57 [0,0 – 1,82]
IL-1β	1,57 [0,0 – 4,32]	1,17 [0,0 – 3,31]	0,72 [0,0 – 3,21]	1,57 [0,0 – 2,97]
IL-2	4,18 [0,0 – 6,83]	5,50 [3,95 – 13,2]	4,88 [0,0 – 9,12]	8,18 [3,24 – 13,8]*
IL-4	4,56 [2,15 – 6,97]	4,93 [2,24 – 10,3]	2,39 [0,0 – 9,04]	5,90 [2,26 – 11,4]
IL-6	1,51 [0,74 – 4,89]	10,8 [1,02 – 24,7]*	5,72 [0,0 – 17,6]*	4,80 [0,0 – 9,46]
IL-8	25,2 [6,84 – 48,1]	49,2 [7,72 – 138]	159 [14,9 – 305]*	17,7 [3,88 – 7,2]
TNFα	7,45 [2,54 – 14,4]	8,58 [2,15 –17,51]	11,4 [0,0 – 31,3]*	4,81 [1,94 – 8,62]

* $p < 0,05$ az egészséges referenciacsoporthoz képest

5.2.2.3 Wilson-kór és citokinek

A Wilson-kór a májban zajló rézmetabolizmus autoszomális recesszív módon öröklődő rendellenessége, aminek az eredményeként a hepatocitákban és egyes extrahepatikus szervekben, így az agyban és a szaruhártyában réz rakódik le. Ennek eredményeként Wilson-kórra a neurodegeneratív betegség és a májbetegség együttes jelenléte a jellemző. A betegségben kialakuló cirrhosis mellett jellegzetes idegrendszeri tünetek (beszédzavar, ataxia és Parkinson-kór szerű extrapiramidális tünetek), a szaruhártyában típusos elváltozás (Kaiser-Fleischner-gyűrű) figyelhetők meg. A tünetek azonban nem mindenkinél vannak egyforma mértékben jelen, van, amikor a májelváltozások és van, amikor az idegrendszeri eltérések dominálnak. A tünetek heterogenitásának az oka nem ismert. A szövődmények hátterében szabad gyökös károsodás, illetve szisztémás gyulladás lehetősége merül fel.

Eredményeink azt mutatták, hogy D-penicillaminnal kezelt Wilson-kóros betegeknél a Cu kivételével számos egyéb elem szintje is megváltozik (19. táblázat). A vörösvértestekben a fémionok közül többnek (Al, Ba, Ca, Fe, Li, Mg és P) a szintje Wilson-kórban neurológiai tünetektől függetlenül emelkedett. Ezen túl a klinikai tünetekkel járó Wilson-kóros betegeknél szignifikánsan nőtt a Pb, Cr, Li és Ni szintje az egészséges kontrollokhoz és a klinikai tünetektől nem szenvedő Wilson-kóros betegekhez viszonyítva.

Wilson-kóros betegeknél számos fémion szintje – a Cu-szintek kivételével– magasabb volt az egészséges referenciaértéknél. Neurológiai tünetekkel járó Wilson-kór esetén a Cr-, a Li-, a Ni- és a Pb-szintek magasabbak voltak a neurológiai tünetekkel nem járó Wilson-kórban szenvedő betegekhez képest.

A rutinlaboratóriumi paraméterek alapján nem volt különbség az idegrendszeri tünetekkel járó és nem járó Wilson-kóros csoport között. Az antioxidáns paraméterek (15. ábra), illetve citokinszintek esetében sem észleltünk szignifikáns különbséget. (20. és 21. táblázatok), bár az IL-6 és az IL-8 szintek az egészséges referenciaértéket meghaladták ($p<0,05$, ill. $p<0,001$).

19. táblázat: Vörösvértestek fémionszintje (átlag ± szórás) egészséges kontrollokban és Wilson-kóros betegekben

Fémion (µg/ml)	Egészséges referenciaérték (n = 31)	Neurológiai tünetekkel	
		nem járó Wilson-kór (n = 16)	járó Wilson-kór (n = 18)
Al	0,270 ± 0,088	0,680 ± 0,231*	0,626 ± 0,180*
Ba	0,007 ± 0,002	0,695 ± 0,108*	0,779 ± 0,150*
Ca	1,451 ± 0,369	3,460 ± 1,168*	3,540 ± 1,023*
Cr	0,139 ± 0,048	0,046 ± 0,029	0,231 ± 0,047**
Cu	0,030 ± 0,012	0,061 ± 0,027	0,076 ± 0,036
Fe	15,03 ± 3,38	29,55 ± 5,40*	31,52 ± 6,07*
Li	0,110 ± 0,032	0,157 ± 0,015*	0,198 ± 0,059*,**
Mg	0,928 ± 0,176	1,896 ± 0,385*	1,764 ± 0,293*
Ni	0,280 ± 0,038	0,089 ± 0,057	0,357 ± 0,245**
P	6,012 ± 2,614	18,762 ± 5,869*	21,145 ± 5,773*
Pb	0,053 ± 0,024	0,082 ± 0,055	0,175 ± 0,083**
Zn	0,471 ± 0,170	0,750 ± 0,423	0,575 ± 0,193

* szignifikancia az egészséges csoporthoz képest ($p<0,05$)

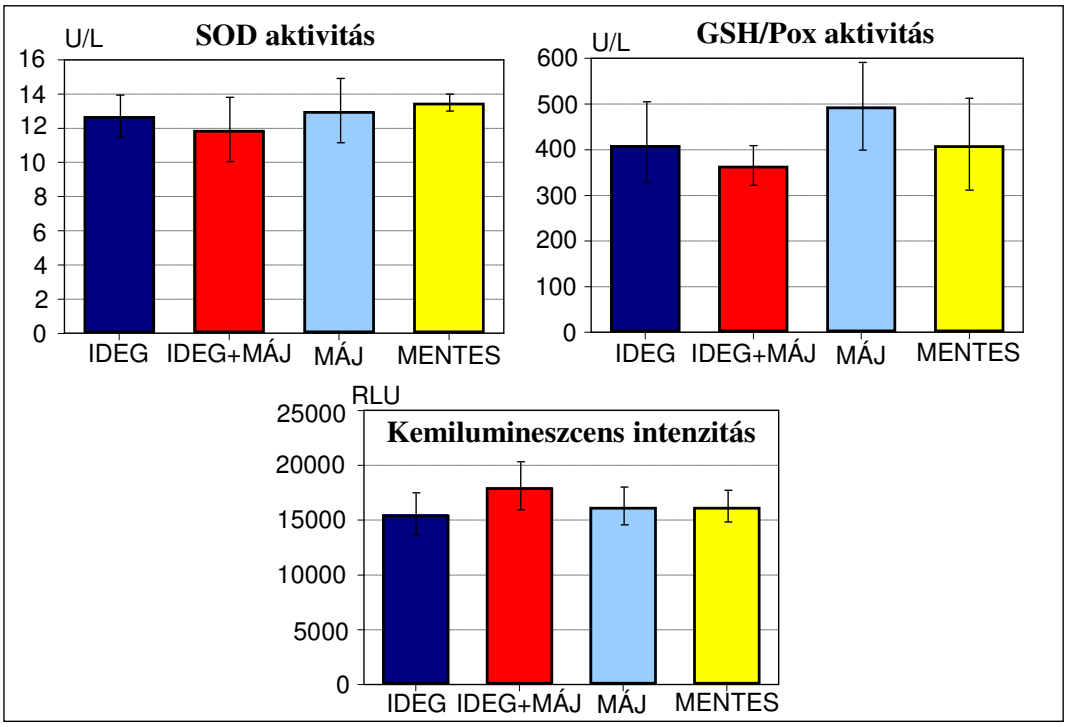
** szignifikancia a két Wilson-kóros csoport között ($p<0,05$)

20. táblázat: Főbb citokinszintek az egyes Wilson-kór altípusokban (tünetmentes: még nincsenek szövődmények; IL = interleukin, IFN = interferon, TNF = tumor nekrózis faktor)

Szérum Citokin (pg/ml)	**Egészséges referenciaérték** n = 26	**Wilson-kór**			
		Idegi érintettség n = 22	**Máj érintettség** n = 6	**Idegi+máj érintettség** n = 7	**Tünetmentes** n = 12
IFNγ	1,78 [0,0 – 3,94]	5,07 [2,85 – 7,60]	6,38 [4,97 – 7,82]	7,25 [3,0 – 12,0]	5,12 [3,01 – 7,55]
IL-10	1,08 [0,0 – 2,07]	0,84 [0,0 – 2,47]	0,42 [0,0 – 0,87]	1,45 [1,36 – 1,54]	1,92 [0,96 – 5,63]
IL-1α	0,64 [0,0 – 1,34]	0,51 [0,0 – 1,02]	0,0 [0,0 – 0,0]	1,37 [0,81 – 1,92]	0,84 [0,51 – 1,09]
IL-1β	1,57 [0,0 – 4,32]	1,98 [1,02 – 4,07]	0,46 [0,0 – 0,88]	3,12 [1,08 – 4,89]	3,48 [1,08 – 11,9]
IL-2	4,18 [0,0 – 6,83]	6,59 [4,70 – 8,52]	4,79 [3,68 – 5,90]	8,83 [7,36 – 11,1]	8,09 [7,36 – 9,40]
IL-4	4,56 [2,15 – 6,97]	3,41 [3,07 – 3,61]	2,76 [2,72 – 2,84]	15,5 [5,03 – 34,9]	4,92 [3,64 – 7,40]
IL-6	1,51 [0,74 – 4,89]	4,81 [0,76 – 14,98] *	7,87 [0,66 – 29,2] *	4,73 [1,89 – 7,72] *	6,77 [0,83 – 35,4] *
IL-8	25,2 [6,84 – 48,1]	89,1 [11,0 – 231] *	62,0 [10,0 – 206] *	81,0 [18,0 – 239] *	41,1 [17,2 – 84,1] *
TNF-α	7,45 [2,54 – 14,4]	12,6 [6,20 – 26,70]	6,27 [4,85 – 8,22]	11,5 [5,96 – 30,7]	9,83 [5,07 – 26,7]

21. táblázat: Klinikai kémiai laboratóriumi paraméterek és antioxidáns védekezés idegrendszeri tünetekkel járó és nem járó Wilson-kórban (*ASAT = aszpartát aminotranszferáz; ALAT = alanin aminotranszferáz, γ-GT = gamma-glutamiltranszferáz, CRP = C reaktív protein*)

Paraméterek	**Neurológiai tünetekkel**	
	nem járó Wilson-kór	**járó Wilson-kór**
	(n = 16)	**(n = 18)**
Fehérvérsejt (G/l)	8,4 ± 2,1	7,8 ± 0,3
Vörösvértest (T/l)	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,18
ASAT (U/l)	23,2 ± 4,3	24,1 ± 5,1
ALAT (U/l)	30,0 ± 12,7	22,2 ± 8,2
γ-GT (U/l)	32,7 ± 12,8	25,6 ± 11,0
ALP (U/l)	207 ± 83,1	182 ± 60,1
Össz-bilirubin (µmol/l)	10,1 ± 2,7	17,6 ± 10,2
Karbamid (mmol/l)	5,9 ± 0,9	5,9 ± 1,4
Kreatinin (µmol/l)	70,2 ± 13,2	82,2 ± 20,3
Cöruloplazmin (mg/l)	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,06
CRP (mg/l)	0,7 ± 0,5	1,4 ± 1,2
H-donor képesség (%)	56,66 ± 7,53	57,6 ± 9,67
Redukálóképesség (µmol/ml)	1,02 ± 0,23	0,92 ± 0,20



15. ábra: Vörösvérsejtekben levő antioxidáns enzimek aktivitása és kemilumineszcens intenzitása a Wilson-kór egyes altípusaiban. (*ideg : csak idegrendszeri tünetek [n = 22]; ideg + máj: idegrendszeri és májérintettség [n = 6]; máj: májérintettség [n = 7]; mentes: még nincsenek szövődmények [n = 16]*)

5.2.3 Citokinek egyéb belgyógyászati kórképekben

5.2.3.1 Citokinprofilt befolyásoló cékla kezelés prosztatakarcinómában

Az utóbbi évek vizsgálatai alapján egyértelművé vált, hogy a tumoros betegek redox-homeosztázisa szignifikáns mértékben különbözik az egészséges egyénekétől. A rák kialakulása és szóródása során a szabadgyökös reakciók és az antioxidáns védekezés közötti egyensúly nagymértékben a szabadgyökös folyamatok irányába tér ki. Ez a felismerés vezetett azokhoz a próbálkozásokhoz, melyek célja, hogy az antioxidáns védekezőképesség javítása révén segítsék a rákelleni védekezést. Munkánk során azt elemeztük, hogy az antioxidáns kezelés milyen hatást gyakorol a citokinszintek és növekedési faktorok szérumszintjére ebben a betegségben.

Prosztatakarcinómás betegeknél az egy hónapig tartó céklakivonat-fogyasztás hatását a citokinszintekre és a redox paraméterekre az 22. és 23. összegzi. A citokinszintek többsége (IFNγ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8) valamelyest (de nem szignifikáns mértékben) csökkent,

vagy nem változott (TNF-α). A VEGF gyakorlatilag nem változott, az EGF közel duplájára nőtt (p=0,003). Hasonlóképpen kismértékben nőtt a PSA és fPSA-szint is (22. táblázat).

A betegek vörösvértestjeiben a Zn-protoporfirin szintje szignifikáns mértékben csökkent, és a szabad protoporfirin-koncentráció is tendenciájában csökkenést mutatott. Az eredmények azt jelezték, hogy jelentős mértékben csökkent a betegek közötti eltérés, amit a kisebb mértékű szórás prezentált. A plazmában és az vörösvértestekben mérhető indukálható szabadgyök-koncentráció a céklakezelést követően valamelyest kisebb volt (23. táblázat).

A szabad protoporfirin/Zn-protoporfirin arány és az vörösvértest TSC értéke (RLU%) között szoros kapcsolatot találtunk ($r = 0,79$, $p < 0,05$). Ha a szabad protoporfirin és a HCHO között vizsgáltuk a lineáris regressziót, akkor szintén szignifikáns korrelációt ($r = 0,91$) igazoltunk.

A céklakezelés előtt a vörösvértestek kötött HCHO koncentrációja $1,02 \pm 0,27 \times 10^{-3}$, és a kezelést követően $3,72 \pm 1,08 \times 10^{-3}$ μmol/mg vörösvértest volt. Tehát egyértelműen nőtt a HCHO pool a betegek szervezetében, ami a vérszegénység mérséklését eredményezte.

A betegek plazma Ca-, Cu- és Mg-koncentrációja a kezelés ideje alatt nem változott jelentősen és minden esetben az egészséges referenciatartományon belül volt. A vaskoncentráció azonban szignifikánsan csökkent a céklafogyasztás hatására és a normál értéktartomány felé mozgott. A Se-szint a kezelés hatására növekedett. Az Zn-koncentráció jelentősen csökkent, az átlagérték az egészséges referenciatartományba esett. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a fémion-homeosztázis kezd helyreállni, a fémionok a sejtekben, kompartmentekben maradnak a cékla fogyasztása kapcsán (24. táblázat).

22. táblázat: Céklakivonat adás hatása kemoterápiában részesülő metasztatikus prosztatarákos betegek citokinszintjeire, illetve a növekedési hormonszintekre (*VEGF, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor; EGF = epidermális növekedési faktor, PSA = prosztataspecifikus antigén, fPSA = szabad prosztataspecifikus antigén, IL = interleukin, IFN = interferon, TNF = tumor nekrózis faktor*)

Szérum citokin	**Céklakezelés**	
	előtt	**után**
IFNγ (pg/ml)	4,28 [0,04 – 9,52]	2,21 [0,30 – 4,18]
IL-10 (pg/ml)	1,54 [0,91 – 4,5]	0,88 [0,19 – 1,91]
IL-1α (pg/ml)	0,54 [0,12 – 2,33]	0,35 [0,19 – 0,52]
IL-1β (pg/ml)	1,18 [0,60 – 4,33]	0,42 [0,10 – 0,92]
IL-2 (pg/ml)	7,80 [4,40 – 15,5]	5,5 [2,20 – 13,3]
IL-4 (pg/ml)	4,70 [2,70 – 8,15]	4,0 [2,00 – 6,20]
IL-6 (pg/ml)	14,2 [4,20 – 36,3]	5,6 [2,30 – 12,1]
IL-8 (pg/ml)	31,2 [17,1 – 223]	25,3 [12,2 – 54,9]
TNF-α (pg/ml)	3,41 [1,60 – 7,50]	3,50 [2,52 – 4,48]
VEGF (pg/ml)	272 [146 – 388]	282 [120 – 442]
EGF (pg/ml)	59,0 [19,0 – 100]	110 [52 – 170] *
PSA ng/ml	93,0 [21,0 – 210]	133 [17 – 320]
fPSA ng/ml	20,2 [10,2 – 68,3]	30,6 [6,5 – 86,7]

* $p < 0,05$

23. táblázat: Cékla-kezelés hatása kemoterápiában részesülő metasztatikus prosztatarákos betegek redox-paramétereire és Zn-protoporfirin-szintjére (*TSC = totál scavanger kapacitás, RLU = relative light unit*)

Paraméterek	Céklakezelés	
	előtt	után
Zn- protoporfirin (nmol/l vvs)	1470 [702 – 223]	857 [559 – 1165]*
Szabad protoporfirin (nmol/lvvs)	334 [85 – 754]	301 [25,0 – 577]
Plazma TSC (RLU%)	3,25 [1,68 – 8,18]	1,69 [0,30 – 3,08]
Vörösvértest TSC (RLU %)	71,8 [11,7 – 132]	54,71 [10,9 – 98,5]

*p<0,05

24. táblázat: Céklakezelés hatása kemoterápiában részesülő metasztatikus prosztatarákos betegek plazmájában a fémion-koncentrációkra

Fémionok (µg/ml)	Céklakezelés	
	előtt	után
Ca	77,82 ± 11,03	77,02 ± 16,44
Cu	1,25 ± 0,28	1,17 ± 0,37
Fe	12,52 ± 9,63	5,49 ± 3,83*
Mg	21,47 ± 3,51	20,95 ± 4,93
Se	0,011 ± 0,006	0,050 ± 0,016*
Zn	1,46 ± 0,60	1,03 ± 0,44*

*p<0,05

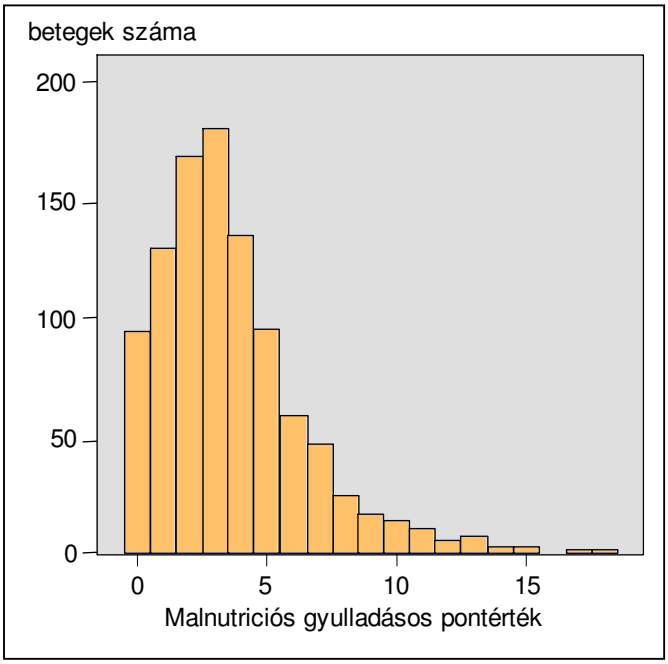
5.2.3.2 Vesetranszplantáció, malnutríció és gyulladás

A krónikus betegségekhez kapcsolódó senyvesztő állapot és az ezt kísérő fokozott gyulladás a malnutríció-gyulladásos komplex szindróma (MICS), ami a betegek fokozott morbiditásával és mortalitásával jár. A MICS felismerését vesetranszplantált betegeknél nehezíti, hogy ennek a vizsgálatára nem áll rendelkezésre validált teszt. Munkánk során több klinikai paraméter, illetve a gyulladásos citokinszintek alapján egy krónikus veseelégtelenségben bevezetett és alkalmazott pontozóskála (malnutríciós-gyulladásos pontérték; Malnutrition

Inflammation Score, MIS) alkalmazhatóságát vizsgáltuk vesetranszplantált betegeknél a MICS kockázatának felmérésére.

A vizsgálat során mért MIS (Malnutrition Inflammation Score)

A pontértékek megoszlását az 16. ábra mutatja. A MIS medián értéke 3 volt; ez szignifikánsan nagyobb volt nőknél (MIS: median, interkvartilis tartomány (IQR): 3 (3); 4,1 *vs.* 3 (3); p<0,001) mint férfiaknál.



16. ábra: Malnutríciós-inflammációs pontérték (MIS) megoszlása vesetranszplantált betegeknél

Az IL-6 medián (IQR) szintje 2,09 (2,37) ng/l, a TNF-α-é 2,06 (1,34) ng/l. Mind a két paraméter fordítottan arányos (IL-6: rho=-0,156; TNF-α: rho=-0,220, p<0,001,). Az IL-6 szignifikáns kapcsolatot mutatott az életkorral (rho=0,247; p<0,001). A CRP median (IQR) értéke 3,1 (5,4) mg/l volt. A CRP egyenesen arányos volt az életkorral (r = 0,146; p<0,001), illetve fordítottan korrelált (r = -0.089; p<0.01).

Malnutrícióra utaló markerek: Az átlagos BMI értéke 27±5 kg/m^2 volt. A férfiak haskörfogata és pre-albumin szintje nagyobb volt a nőkhöz képest (103±13 cm *vs.* 93±14 cm; p<0,001 és 36,5±7,6 mg/dl *vs.* 32,1±6,8 mg/dl; p<0,001).A malnutrícióra és gyulladásra utaló főbb paramétereket a 25. táblázat összegzi.

25. táblázat: Malnutríciós és gyulladásos paraméterek a vesetranszplantált betegeknél (*SD = szórás, IQR = interkvartilis tartomány, NS = nem szignifikáns*)

	Összes beteg (n=993)	**Férfiak (n=569; 57%)**	**Nők (n=424; 43%)**	**p**
MIS (median (IQR); átlag)	3 (3); 3,6	3 (3); 3,2	3 (3); 4,1	<0,001
Testtömeg (kg) (átlag ± SD)	75 ± 16	81 ± 15	68 ± 13	<0,001
Haskörfogat (cm) (átlag ± SD)	99 ± 14	103 ± 13	93 ± 14	<0,001
BMI (kg/m2) (átlag ± SD)	27 ± 4,9	27,2 ± 4,6	26,7 ± 5,2	NS
CRP (mg/l) (median (IQR))	3,1 (5,4)	3,1 (4,8)	3,4 (5,8)	NS
Albumin (g/l) (átlag ± SD)	41 ± 4	42 ± 4	40 ± 4	<0,001
Pre-albumin (g/l) (átlag ± SD)	0,346 ± 0,076	0,365 ± 0,076	0,321 ± 0,068	<0,001
Interleukin-6 (ng/l) (median (IQR))	2,09 (2,37)	2,04 (2,02)	2,15 (3,20)	NS
Leptin (µg/l) (median (IQR))	15,1 (25,3)	10,7 (15,44)	28,04 (40,1)	<0,001
TNF-α (ng/l) (median (IQR))	2,06 (1,34)	2,10 (1,31)	1,95 (1,34)	NS

A MIS és a különböző gyulladásos és malnutríciós paraméterek közötti kapcsolatok erősségét a 26. táblázat összegzi. A haskörfogat összefüggött az életkorral ($r = 0,299$; $p < 0,001$), míg az eGFR értékkel nem. A pre-albumin-szint az életkorral ($r = -0,068$; $p<0,05$) és az eGFR értékkel fordítottan arányos volt ($r = -0,263$; $p<0,001$).

26. táblázat: A MIS score és a legfontosabb laboratóriumi, antropometriás és demográfiás adatok közötti nem korrigált és korrigált összefüggések erőssége (*CRP = C-reaktív protein, GFR = glomeruláris filtrációs ráta, IL = interleukin, TNF = tumor nekrózis faktor*)

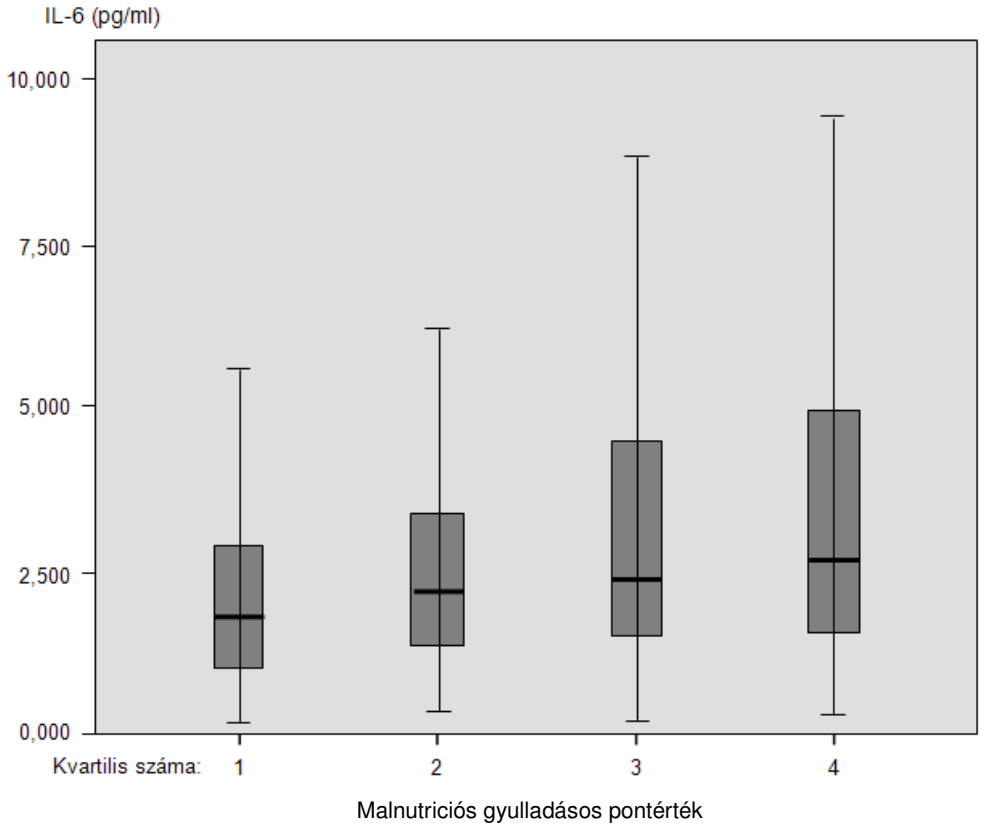
Korrelációs koefficiens ®	MIS	Korra, nemre korrigált r érték
Életkor	0,213*	-
Testtömeg	-0,254*	-0,297*
Haskörfogat	-0,144*	-0,214*
Becsült GFR	-0,281*	-0,217*
Dialízisen eltöltött idő	0,040	0,025
IL-6	0,231*	0,165*
TNF-α	0,102*	0,109*
Leptin	-0,057	-0,140*
CRP	0,094*	0,194*
Összkoleszterin	-0,021	-0,053
Prealbumin	-0,165*	-0,116*
Ferritin	0,125*	0,181*
Hemoglobin	-0,315*	-0,300*

***: p<0,01**

Nőknél nagyobb volt a szérum leptin szint, mint a férfiaknál (median (IQR): 28 (40) µg/l *vs.* 11 (15) µg/l; p<0,001), egyenesen arányos volt az életkorral (rho=0,092; p<0,01), míg fordítottan arányos volt az eGFR értékkel (rho=-0,159; p<0,001).

Gyulladásos markerek:

A szérum IL-6-szint a MIS kvartilisek alapján képzett négy alcsoportban a MIS emelkedésével arányosan egyre magasabb volt (p<0,001) (17. ábra).

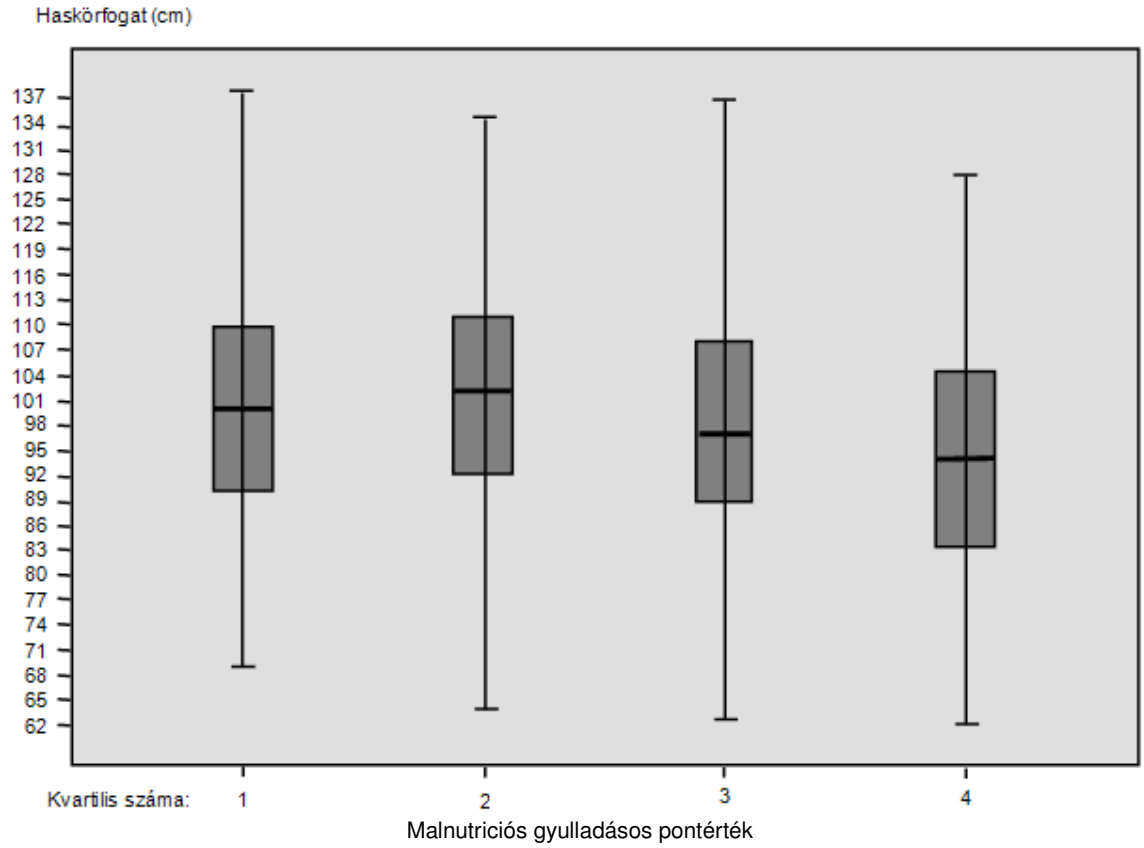


17. ábra: Interleukin IL-6-szint a MIS kvartilisek alapján képzett négy alcsoportban

Hasonló trendet észleltünk a TNF-α esetében is (median (IQR) érték: első MIS kvartilisben: 1,99 (1,17) ng/l; második MIS kvartilisben: 2,07 (1,40) ng/l; harmadik MIS kvartilisben: 2,02 (1,30) ng/l; negyedik MIS kvartilisben: 2,27 (1,64) ng/l; p<0,05). A MIS szignifikánsan összefüggött a gyulladásos citokinek szintjével (IL-6; TNF-α; CRP), a kapcsolat szignifikáns maradt az életkorra és nemre történő korrekciót követően is. A MIS fordítottan arányos volt az eGFR értékével (r = -0,281) és a hemoglobin szinttel (r = -0,315), illetve egyenesen arányos volt a szérum ferritinnel (rho=0,125).

Malnutríciós markerek

Az alcsoportokban a haskörfogat mediánértéke a nagyobb MIS kvartilisekben szignifikánsan csökkent (p<0,001) (18. ábra)



18. ábra: Haskörfogat a MIS kvartilisekben

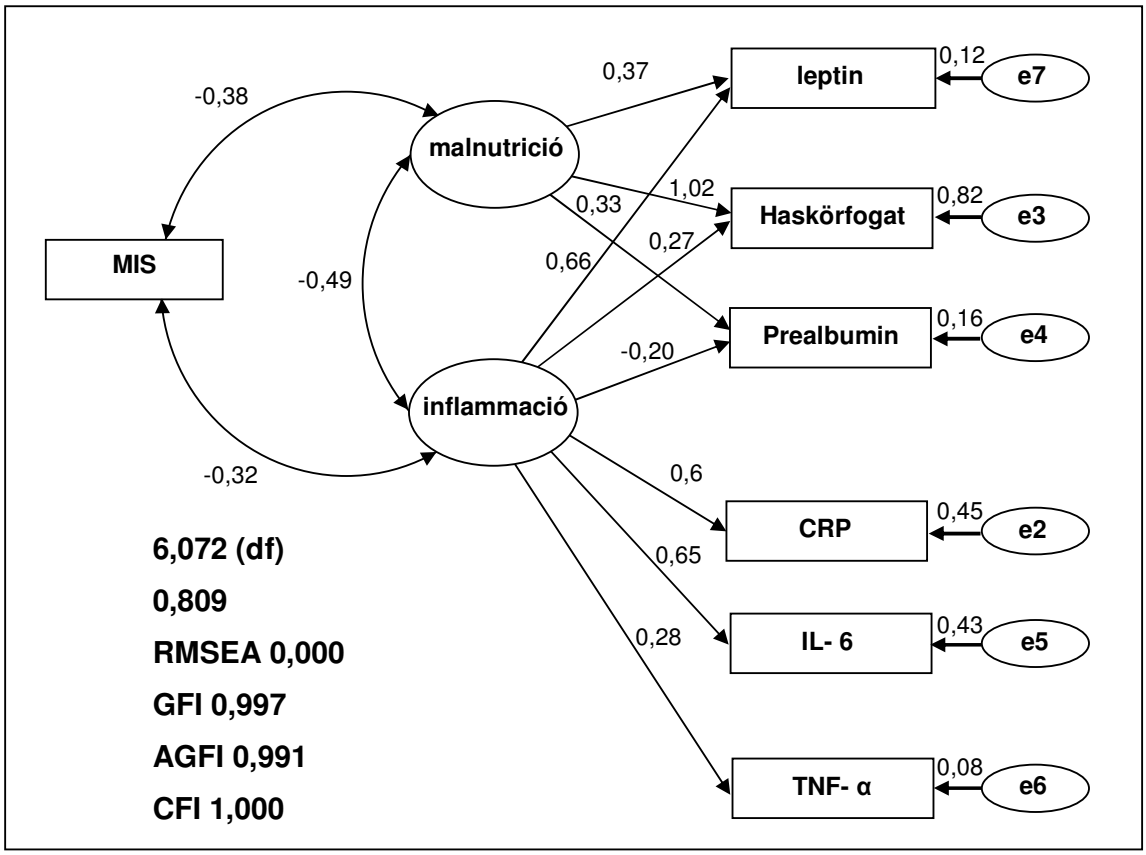
A szérum prealbumin szint a MIS kvartilisek alapján képzett alcsoportokban folyamatosan csökkent (átlag ± SD): első kvartilis : 35,9 ± 7,3; második kvartilis: 34,4 ± 7,2; harmadik kvartilis: 33,7 ± 7,6 és negyedik kvartilis: 33,1 ± 8,3; p<0,001. A MIS pontérték szignifikánsan összefüggött a tápláltsági állapotot tükröző paraméterekkel (leptin; testtömeg, haskörfogat és prealbumin szint). A korra és nemre való korrekciót követően is szignifikánsak maradtak ezek az összefüggések.

MIS strukturális egyenletmodellek

Annak ellenőrzésére, hogy a MIS valóban mind a gyulladást, mind a tápláltsági állapotot méri, a “strukturális egyeneletek modellezése” (SEM) módszert alkalmaztuk 1 vagy 2 látens változó feltételezésével. A ”látens változók” a “gyulladás” és a “malnutríció” feltételezett komponenseknek felelnek meg a MIS összpontszámon belül. A két látens változós modell

pontosabban illeszkedett a vizsgálat adataihoz, mint a csak egy kompozit változót feltételező modell.

A 19. ábra a MIS strukturális egyenletmodell által feltételezett összefüggéseket, azok erősségét és irányát mutatja.



19. ábra: Strukturális egyenletmodell két latens változóval és az egyes változók közötti kapcsolat erősségével. Részleteket lásd a szövegben

A két latens változót feltételező modellben a malnutríciós latens változó és a MIS közötti kovariancia érték szignifikánsan eltért nullától (-2,92, $p<0,001$), a korreláció értéke -0,38 volt. A latens gyulladásos változó és a MIS közötti kovariancia érték 1,49, a korreláció értéke pedig 0,32 volt ($p<0,001$).

6 Megbeszélés

Az immunrendszer sejtjei között a kommunikáció citokineken, ezeken a kisméretű, 8 000-40 000 Da nagyságú fehérjemolekulákon keresztül valósul meg. A citokinek fokozzák vagy gátolják az immunkompetens sejtek aktiválását, proliferációját és differenciálódását, ezáltal szabályozzák az immunfolyamatokat, az immunválasz intenzitását, tartamát, az ellenanyagok szintézisét és további citokinek termelését.

A citokinszintek mérésére általánosan elterjedtek az immunanalitikai módszerek. Ezek egészen a legutóbbi időkig egy-egy specifikus analit mérését tették lehetővé, így sokáig nem volt lehetőség arra, hogy a citokineket mint egy komplex rendszer részét egyszerre vizsgáljuk. A pár éve bevezetett multiplex citokinszintmérő rendszerek ezért jelentettek áttörést. Magyarországon elsőként volt alkalmunk az összehasonltó vizsgálatokat elvégezni, és a rendszereket tesztelni reprezentatívnak minősülő betegpopuláción. A Semmelweis Egyetem Klinikáival szoros kooperációban mód nyílt a különböző klinikai esetekben a betegség-imunprofil megnyugtató feltérképezésére. Vizsgálataink során összehasonlítottuk a különböző multiplex rendszerekkel kapott eredményeket, illetve néhány betegségben meghatároztuk a jellemző citokinprofilt.

Kezelési módok hatásosságának felmérésére, illetve azok mellékhatásainak vizsgálatára is sor került.

6.1 Összehasonlító vizsgálatok

A különböző mérési rendszerek között lényeges különbségek vannak (antitestek eltérőek, vizsgálat menete változó, eltérő a módszerek érzékenysége stb.) Ez megnehezíti a kapott eredmények összehasonlítását. Az irodalomban a különböző multiplex rendszerek alkalmazásával nyert értékek összehasonlítására vonatkozóan nem találtunk adatokat. Célkitűzésünk annak a vizsgálata volt, hogy két multiplex rendszer (Biochip® és Bioplex®), azaz a chip felületre kötött antitestek vagy a mikrogyöngyök felületére kötött antitestek segítségével mért citokinszint-eredmények mennyire szorosan függnek össze, illetve, hogy az ezekkel mért egyik analit (IL-6) érték összevethető-e egyedi IL-6 mérő ELISA-kittel kapott eredményekkel.

Eredményeink egyértelműen jelzik, hogy a multiplex citokinszint-meghatározásra alkalmas Biochip és Bioplex rendszerekkel az IL-6-szint gyakorlatilag az összes, az IL-2, IL-8, IL-10, TNF-α, IL-4, IFNγ viszont csak az esetek egy részénél mérhető az egészséges önkéntesekben. Az egyes mérési rendszerekkel kapott eredmények – bár bizonyos esetekben szoros kapcsolat áll fenn közöttük – alapvetően rendszer-specifikusak. Ezért alapvetően fontos, hogy egy adott laboratórium egy adott kísérlethez mindig ugyanazt a rendszert alkalmazza. Az

egy adott rendszerrel mért citokinértékek nem használhatóak fel olyan kísérletek során, melyekben egyéb módon (is) mértek citokinszinteket.

Az esetenként gyenge erősségű összefüggéseken túl az egyes rendszerekkel mért citokinszintek között szisztémás eltérést is kimutattunk. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy az egyes rendszerek esetében a vizsgálatot végző laboratóriumnak külön-külön meg kell határoznia az egészséges populációra vonatkozó referenciaértéket, illetve, hogy a referenciaérték feltüntetése mellett érdemes jelezni, hogy milyen módszerrel történt a meghatározás.

6.2 Citokin-profil vizsgálata fiziológiás és patológiás körülmények között

6.2.1 Citokinszintek perinatális jelentősége

Kísérleti adatok alapján az újszülöttkori posztaszfixás agykárosodásban a gyulladásnak, illetve az aktivált immunsejtek okozta idegsejt-károsodásnak központi szerepe van [*Scher és mtsai* 2001]. Az immunaktivációt a gyulladásos citokinek, az IL-1, IL-2, IL-6, TNFα és IFNγ [*Damman és mtsai*, 1997; *Xanthou*, 2002] szintek emelkedése is jelzi, melyek a gyulladás kiváltásában és fenntartásában egyaránt közrejátszanak. A gyulladásos citokinek szintje perinatális aszfixiát követően ugrásszerűen nő [*Aly és mtsai* 2006, *Okazaki és mtsai* 2006, *Xanthou és mtsai* 2002].

Az elhúzódó terápiás hipotermia igazoltan javítja a kimenetelt, ezért egyre elterjedtebben használják [*Azzopardi és mtsai* 2007, *Jacobs és mtsai* 2007]. A hipotermia idegvédő hatásának egyik eleme a szisztémás gyulladásra kifejtett gátló hatás lehet. Célkitűzésünk az volt, hogy a pro- és antiinflammatorikus citokinek posztnatális kinetikája alapján jellemezzük a hipotermia gyulladásra gyakorolt hatásait aszfixiás eredetű újszülöttkori encefalopátiás gyermekekben, illetve ellenőrizzük a kezelés hathatósságát.

Adataink alapján perinatális aszfixiát követően az első 72 életóra alatt a szérum citokinszintek a posztnatális kortól, valamint a hipotermiás kezeléstől függően változnak. A 6. életórában az IL-6-koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak voltak a hipotermiás gyermekeknél a normotermiásokhoz képest, illetve egyéb citokinek esetében is kisebb értékek iránti tendenciát észleltünk. Mindamellett mind a két csoportban a pro- és antiinflammatorikus citokinszintek a születést követő 72 óra alatt csökkentek, illetve a Th1- és Th2 citokinek aránya a Th2 dominancia irányába tolódott el.

A perinatális adaptáció során ismert, hogy szisztémás gyulladásos reakció van jelen, azonban csak néhány vizsgálat során elemezték több időpontban egyszerre többféle citokin szintjét [*Protonotariou és mtsai* 1999, *Sarandakou és mtsai* 1998]. Neonatalis encefalopátia esetében a citokinszint-kinetikára vonatkozó humán adatok azonban teljesen hiányoznak.

Korábbi vizsgálatok alapján hipoxiás-iszkémiás inzultus esetén az IL-6, IL-8 és IL-10 szintek a plazmában [*Aly és mtsai* 2006, *Okazaki és mtsai* 2006, *Xanthou és mtsai* 2002] vagy az agyszövetben [*Saliba és mtsai* 2001, *Szaflarski és mtsai* 1995, *Grow és mtsai* 2002] összefügghetnek a neurológiai károsodás mértékével [*Xanthou és mtsai* 2002]. Xanthou és munkatársai IL-6, IL-1β és TNF-α plazmaszinteket vizsgáltak 1, 3 és 5 napos posztaszfixiás és szeptikus kora- és újszülötteknél. Kimutatták, hogy az IL-6 szintek mind a két csoportban az egészséges kontrollokhoz képest nagymértékben nőttek, azonban a 3 napra hasonlóak lettek. Megfigyelésünk, miszerint posztaszfixiás újszülötteknél a szérum IL-6 citokinszintek a 6. és 72 életórában csökkennek, megfelelnek ezeknek az adatoknak.

Teoretikusan a kedvező klinikai hatások alapján arra lehetne számítani, hogy az elhúzódó mérsékelt hipotermia a hipoxiás-iszkémiás inzultust követően immunmoduláns hatást fejt ki és gátolja a szisztémás gyulladást. *In vitro* és állatkísérletes adatok szerint a hipotermia, legalábbis rövid távon, csökkenti a gyulladásos és fokozza az antiinflammatorikus folyamatokat [*Beilin és mtsai 199*8, *Fairchild és mtsai* 2000, *Gundersen és mtsai* 2001, *Matsui és mtsai* 2006, *Qing és mtsai* 2001, *Scumpia és mtsai* 2004].

Posztaszfixiás újszülöttekben a hipotermia gyulladásra gyakorolt hatásával kapcsolatosan eddig egyetlen humán adat áll rendelkezésre [*Akisu és mtsai* 2003]: posztaszfixiásoknál a likvorban a trombocita eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor, PDGF) szintje hipotermiás körülmények között kisebb, mint normotermia mellett.

Mivel az IL-6 központi szerepet játszik a citokinkaszkád szabályozásában, kitüntetett figyelemmel elemeztük az IL-6-szint hipotermiában bekövetkező változását. A hipotermiás kezelést a megszületést követően körülbelül 3 órán belül kezdtük el, amikor a citokinválasz várhatóan már megkezdődött. Az a megfigyelésünk, miszerint 6 óránál a szérum IL-6 szintek hipotermiában szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint normotermia mellett, illetve, hogy a hűtés időtartama egyértelműen befolyásolja az aszfixiát követő gyulladásos válasz mértékét, azt a hipotézist támasztja alá, hogy a hipotermia neuroprotektív hatásában a hipotermia gyulladásgátló hatása is szerepet játszik. *Szabó és mtsai* [2008] További vizsgálatokra lenne szükség ennek megerősítésére, bár ezek kivitelezése – mivel napjainkban a terápiás célú mérsékelt hipotermia az újszülöttkori posztaszfixiás agykárosodás ellátásának a rutin részét képezi – etikai korlátokba ütközik.

Azt is kimutattuk, hogy a gyulladáscsökkentő hatású IL-10 citokin szérumszintje a születést követő 6 – 72 óra között nagymértékben csökken. Ebben az esetben a hűtött és nem hűtött gyermekek között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget. A hipotermia IL-10 szintekre gyakorolt hatására vonatkozó kísérletes adatok ellentmondásosak. Míg *Matsui és*

mtsai [2008] szerint újszülöttkori patkány mikroglia tenyészetben hipotermiás körülmények között az IL-10 citokinszint-termelés alacsonyabb, egy másik vizsgálat szerint emberben hipotermiás körülmények között végzett szívműtétet követően az IL-10 szintek emelkedtek [*Buttram és mtsai* 2007]. Érdekes módon, bár arra lehetne számítani, hogy az IL-10 adás neuroptrotektív agykárosodást követően, *Kline és mtsai* [2002] egy patkánymodellben kimutatták, hogy IL-10 adás gátolja a hipotermia agykárosodásra kifejtett kedvező hatását.

Míg a kísérletes adatok többsége szerint hipotermia esetén a gyulladás intenzitása csökken [*Fairchild és mtsai* 2000, *Quing és mtsai*, 2006; *Russwurm és mtsai* 2002], egyes *in vitro* megfigyelések szerint az enyhe hipotermia gyulladásfokozó hatású, mivel emeli az IL-1-β, IL-6, IL-12p70 és TNF-α szinteket [*Matsui,* 2006], illetve csökkenti az IL-10 szintet [*Matsui és mtsai* 2004]. Ezen túl enyhe hipotermia mellett szeptikus betegeknél is emelkedik a gyulladásos citokinek szintje [*Fairchild és mtsai* 2004]. Mások egy reszuszcitációt követő szisztémás gyulladást elemző patkánymodellben nem észlelték a hipotermia gyulladásgátló hatását [*Callaway és mtsai* 2008].

Munkánk során a citokineket biológiai hatásuk alapján csoportosítottuk és a REV értékekben bekövetkező változásokat elemeztük. Külön vizsgáltuk a Th2-Th1 arányt jellemző IL-4 / IFN-γ arányt is. Adataink szerint a posztnatális kor és a hipotermia valamelyes hatást fejtett ki a citokinekre, azaz egy olyan tendenciát észleltünk, ami alapján a posztnatális kor előrehaladtával és hipotermia mellett alacsonyabbak a szintek, azonban a leginkább szembetűnő változás az IL-4 / IFN-γ arányban a 6 és 72 óra közötti időszakban bekövetkező emelkedés volt. Ez a jelenség a hűtött és a nem hűtött csoportban egyaránt kimutatható volt. Egészséges kontrollcsoport hiányában nem lehet eldönteni, hogy ez a jelenség a szülést követő természetes posztnatális adaptáció része, vagy pedig a perinatális aszfixiára adott gyulladásos válasz normalizálódásának az eredménye-e.

A koraszülöttek egy részében az adekvát terápia ellenére is súlyos gyulladásos szövődmények, elsősorban légzőszervi és idegrendszeri károsodások lépnek fel. E szövődmények hátterében egy közös pathomechanizmus, a „magzati gyulladásos válaszreakció szindróma” (Fetal Inflammatory Response Syndrome) körvonalazódott [*Andrews és mtsai* 2000, *Dammann és mtsai* 2005, *Erdei és mtsai* 2003, *Gomez és mtsai 19*98, *Keelan és mtsai 19*99]. Ennek lényege a magzati korban az immunrendszer generalizált aktivációja. A magzati gyulladásos válaszreakció szindróma során a magzat szervezetében a proinflammatorikus citokinek, elsősorban az interleukin-6 szintjének emelkedése következik be. A gyulladásos citokinek szintjét a perinatális fertőzés alapvetően meghatározza. Emellett azonban teoretikusan számos egyéb tényező, így az alkalmazott terápia és az endokrin státusz is modulálhatja a gyulladás intenzitását.

Koraszülötteknél a keringő kortizolszintet számos tényező befolyásolja: a hipotalamusz-hipofízis tengely éretlensége, a szülés módja és az azzal járó stressz-reakció, perinatális események (aszfixia, légzési elégtelenség), az alkalmazott kezelés (antenatális anyai szteroid kezelés). Egyes esetekben átmenetileg nem termelődik elegendő endogén kortizol, ami miatt a koraszülött nem képes a kardiovaszkuláris és a biokémiai homeosztázis fenntartására, relatív mellékvese-elégtelenség következik be [*Ng,* 2008]. Az alacsony endogén kortizolszintek mellett szisztémás hipotenzió jelentkezhet [*Ng,* 2004]. Kora- és újszülöttek esetében szoros kapcsolatot találtak a morbiditás és a relatív mellékvese-elégtelenség között. [*Langer,* 2006] Ebben a kardiovaszkuláris instabilitás mellett szerepe lehet a fokozott gyulladásnak, illetve a rendkívül magas gyulladásos citokinszinteknek is. Az alacsony kortizolszintnek nemcsak koraszülötteknél, hanem patológiás állapotú érett újszülötteknél bekövetkező gyulladásos válaszreakcióban is lehet szerepe. Célkitűzésünk az volt, hogy elemezzük koraszülötteknél az egyik legfontosabb gyulladást befolyásoló hormon, az endogén módon szintetizált kortizol és a gyulladásos citokinek szintje közötti kapcsolatot. Ezen túl vizsgálni kívántuk aszfixiás újszülöttek esetében is a gyulladásos válasz és az endogén kortizolszintek közötti kapcsolatot.

A stressz vagy betegség hatására felszabaduló kortizol elengedhetetlen a túléléshez [*Fernandez és mtsai* 2009]. Relatív mellékvese-elégtelenségről akkor van szó, ha a betegnél nem szabadul fel megfelelő mennyiségű kortizol a stressz / betegség hatására. Számos vizsgálat igazolta, hogy ilyen esetben nő a morbiditás és mortalitás.

A mellékvesekéreg-elégtelenség különösen gyakori súlyos állapotú, szeptikus betegeknél. Elsősorban akkor szokott felmerülni ez a lehetőség, ha a súlyos sokkban lévő beteg nem reagál a hagyományos sokkellenes kezelésre [*Langer és mtsai* 2006]. Diagnosztikájában elsősorban a teljes kortizolszint mérése segít. Intenzívosztályon kezelt felnőtteknél a mellékvese-elégtelenségben szenvedő betegeknél az alapbetegség életveszélyes állapotoktól az enyhébb szervi elégtelenségig terjedhet [*Shenker és mtsai* 2001]. Mivel nincsenek anamnesztikus adatok, a kortizolszintet nem monitorozzák rutinszerűen, illetve számos társbetegség is jelen van, az egyértelmű diagnózis gyakran késik.

A relatív mellékvese-elégtelenség klinikai megjelenési formája általában a katekolamin-függő hiperdinámiás sokk, ami szteroidokra reagál [*Nieboer és mtsai* 2000]. A szteroidokra adott paradox válasz hátterében sejtszinten a glükokortikoidokra adott válaszkészség csökkenése állhat. A glükokortikoidok a sejtmembránban jelen lévő adrenerg receptorok intracelluláris szignalizációját biztosítják, ez glükokortikoid-hiány esetén csökken [*Bennett és mtsai* 1999]. A mellékvese-elégtelenség gyanúját felvetheti az eozinofília [*Beishuizen és mtsai* 1999], nem

megmagyarázható hipotermia, hiperpigmentáció, hiperkalémia és hiponatrémia, émelygés, hányás és hasi fájdalom, valamint a folyadékra, katekolaminra nem reagáló hipotenzió.

Egyre több bizonyíték jelzi, hogy a relatív mellékvese-elégtelenség szerepet játszik koraszülötteknél a hemodinamikai instabilitás és hipotenzió kialakulásában, azonban továbbra sem ismert, hogy mennyire hatásos vagy biztonságos ennél a populációnál a glükokortikoidok pótlása. Nagyon éretlen, 30. gesztációs hét előtt született koraszülötteknél gyakran mérnek súlyos artériás hipotenzió esetén alacsonyabb kortizolszinteket [*Heckmann és mtsai* 2001].

Koraszülöttekkel kapcsolatosan végzett munkánk során azt elemeztük, hogy a relatív mellékvese-elégtelenségnek van-e nem kardiovaszkuláris következménye. Vannak ugyanis arra vonatkozó adatok, hogy az élet első hetei során fennálló csökkent mellékvese-működés esetén nő a bronchopulmonáris diszplázia (BPD) kockázata [*Heckmann és mtsai* 2001]. Mivel ismert, hogy a BPD pathomechanizmusában a gyulladás központi szerepet játszik [*Bokodi és mtsai* 2007], ezért megalapozottnak tűnt az a felvetés, hogy az alacsony endogén kortizolszint mellett nagyobb lehet a gyulladásos reakcióban szerepet játszó citokinek szintje.

A kérdés vizsgálatát megnehezíti az a tény, hogy koraszülöttekre vonatkozóan nem állnak rendelkezésre egészséges referenciaértékek, illetve, hogy a citokinszintek nagymértékű egyéni variabilitást mutatnak. Az előbbi problémát azzal oldottuk meg, hogy a ’relatív’ adrenális inszufficiencia kifejezés helyett medián alatti – ’alacsony’ –, illetve medián feletti – ’magas’ – kortizolszintű csoportokat definiáltunk és ezek a citokinszintjeit hasonlítottuk össze. A citokinszintek összehasonlítására az 5.2.1.1. pontban ismertetett REV paramétert vezettük be.

Eredményeink egyértelműen jelzik, hogy az alacsony kortizolszintekkel rendelkező koraszülötteknél a gyulladásos citokinek szintje emelkedik, illetve, hogy ez a jelenség az éretlenebb kohortokban még kifejezettebb. Azaz a mellékvese-működés és a szisztémás gyulladás mértéke koraszülötteknél szorosan összefügg, aminek esetleg szerepe lehet a koraszülötteket fenyegető perinatális szövődmények kialakulásában és kockázatában. Eredményeink azt a lehetőséget is felvetik, hogy a veszélyeztetett populációkban a csökkent mellékveseműködés kompenzálásaként érdemes lehet a glükokortikoidok pótlásával próbálkozni – az ilyen indikációval kapcsolatban végzett terápiára vonatkozóan azonban a biztonságossági és hatásossági adatok még hiányoznak. Ezekkel kapcsolatosan további vizsgálatokra van szükség.

A rendelkezésre álló adatok lehetővé tették annak meghatározását, hogy a prenatálisan az anyánál végzett szteroidkezelés befolyásolja-e posztnatálisan az újszülöttben mérhető kortizolszintek kinetikáját. Bár teoretikusan a hipofízis-mellékvese tengely szuppressziójának a lehetősége fennáll, adataink alapján ezzel nem kell számolni.

Másik elemzésünket aszfixiás újszülöttek esetében végeztük. Eredményeink ebben az esetben is igazolták, hogy az endogén kortizolszint a szisztémás citokinszintekre döntő hatást gyakorol. Az alacsony kortizolszintű csoportokban a proinflammatorikus citokinek (IFN-γ, IL-1, IL-2, IL-6, TNFα) szintje nőtt, míg az antiinflammatorikusaké (IL-4, IL-10) csökkent a magasabb kortizolszintű csoportokhoz képest. A kortizol jelentőségét IL-10, IL-10 / IL-6, IL-10 / IL-2, IFN-γ és a kortizol, illetve a terápia – kortizol és posztnatális kor –kortizol közötti szignifikáns interakciók is alátámasztják, amelyek azt jelzik, hogy az alacsonyabb kortizolszintek esetén kifejezettebb a szisztémás gyulladás posztaszfixiás koraszülöttek esetében is. Fontos megjegyezni azt is, hogy a hipotermiás koraszülöttek esetében a kortizolhiány és a gyulladásos citokinek közötti összefüggés kifejezettebb. Ez megfelel azoknak az irodalmi adatoknak, melyek szerint súlyos szepszisben, amikor nagy a mellékvese-elégtelenség kockázata, a terápiásan alkalmazott hipotermia során fokozódhat a gyulladásos reakció [*Fernandes és mtsai* 2008; *Marik és mtsai* 2007].

Kora- és újszülöttkorban a szisztémás bakteriális fertőzés sokszor igen rapid lefolyású, ezért a gyors diagnózis alapvetően fontos a hatékony terápia mielőbbi bevezetése és a súlyos szövődmények megelőzése érdekében. A diagnózis felállítását a bakteriális gyorstesztek és a hemokultúra mellett az akut fázis fehérjék szintjének, elsősorban a magasabb CRP, IL-6 és prokalcitonin szint kimutatása segíti; ezek monitorozása támpontot ad abban is, hogy a terápia mennyire hatásos. Célkitűzésünk az volt, hogy elemezzük, a biochip módszer segítségével meghatározott citokinszintek adnak-e járulékos információt szeptikus újszülötteknél a prokalcitonin- és CRP-szintek mellett.

A perinatális szepszis azonnali diagnózisa jelenleg is nagy kihívást jelent a klinikusok számára [*Arnon és mtsai* 2008, *Burke és mtsai* 2009, *Mishra és mtsai* 2006]. Roppant nagy szükség lenne olyan gyors és pontos vizsgálati eljárások kidolgozására, melyek alapján a szepszisre gyanús gyermekeknél azonnal el lehetne kezdeni a kezelést.

A szepszis diagnózisa egyértelmű, ha a hemokultúra eredménye pozitív. A hemokultúra viszont időt vesz igénybe, míg a kezelés megkezdésével nem lehet várni. Ezért a perinatális szepszist a hemokultúra eredményének megérkezéséig döntően a klinikai tünetek [*Dollner és mtsai* 2001] és a laboratóriumi vizsgálatok eredményén diagnosztizálják. Utóbbiak közül a klinikai gyakorlatban a CRP- és a prokalcitoninszint mérése terjedt el, ezek negatív prediktív értéke 20 mg/l, illetve 10 μg/l melletti cutoff érték esetén 90% feletti.

Munkánk során a klinikai tünetek és a terápiás válasz alapján azt elemeztük, hogy az IL-6, IL-8 és IL-10 citokinszintek mérésével segíthető-e a korai szepszis diagnózisa újszülötteknél.

Az általunk vizsgált populációban az első napon, az antibiotikus kezelés megkezdése előtt mért a CRP- és/vagy prokalcitonin-szint a szeptikus újszülöttek 63,4%-nál jelezte a betegséget. Érdekes módon az ezek mellett vizsgált citokinek szintje csak a gyermekek töredékénél haladta meg azt a cutoff értéket, ami felett az irodalmi adatok alapján szepszisről van szó [*Bender és mtsai* 2008], ami jelzi, hogy a perinatális szepszis korai fáziásnak a laboratóriumi diagnosztikájában alapvetően erre a két paraméterre érdemes hagyatkozni.

Fontos megjegyezni, hogy az általunk vizsgált szeptikus újsülöttek esetében az emelkedett IL-8 szint járulékos információt jelenthet. Az IL-8 cut-off értékét meghaladó betegek közül ugyanis hatnál (a vizsgált populáció 15%-nál) sem a CRP, sem a prokalcitonin-szint nem utalt szepszisre. Az IL-8 szint rutinszerű mérésével és 90 pg/ml-s cut-off érték alkalmazásával az általunk vizsgált, veleszületett szepszisben szenvedő újszülötteknek 78,4%-a azonosítható. Eredményeink szerint viszont ebben a kísérleti felállásban az IL-6 és az IL-10 szinteknek nincs prediktív értéke. (Érdemes azonban azt is megjegyezni, hogy a kismértékben emelkedett fehérvérsejt-számnak sem volt ebből a szempontból kiemelt jelentősége.)

Vizsgáltuk, hogy az általunk mért citokinszintek hogyan változnak akutan az antibiotikus kezelés bevezetésekor. (A vizsgálatba vont újszülöttek állapota az antibiotikus kezelés bevezetésekor lényegesen javult, a terápia végére az újszülöttek meggyógyultak.) Az első három életnapon dinamikusan csökkenő prokalcitonin-szintet és mérsékeltebb ütemben csökkenő CRP-szintet mutattunk ki [*Fehér és mtsai* 2008]. A vizsgált citokinek ebből a szempontból nem voltak informatívak, bár meg kell jegyezni, hogy mindegyik citokin szintje csökkenő tendenciát mutatott. Adataink alapján azt nem lehet megmondani, hogy a mért adatok milyen mértékben jelezték a terápiás választ és/vagy az esetleg fennálló gyulladás progresszióját, illetve azt, hogy a születés során tranziensen emelkedő citokinszintek normalizálódnak [*Buonocore és mtsai* 1995, *Chisea és mtsai* 2001, *Rizos és mtsai* 2007, *Sarandakou és mtsai* 1998]. A kérdést egészséges újszülöttek bevonásával és szekvenciális vizsgálatával lehetne eldönteni, erre azonban etikai okok miatt nincs sok lehetőség.

Az általunk vizsgált fehérjék akut fázis fehérjék, így elemeztük a közöttük fennálló kapcsolat erősségét, ez azonban csak elvétve volt szignifikáns mértékű. Ez annak a jele, hogy a mért analitok a gyulladásos választ más-más aspektusból képezik le, a gyulladásos folyamatot eltérő kinetikával követik, azaz hipotetikusan eltérő élettani folyamatokat tükröznek. Bár ezek vizsgálata az alapkutatás szempontjából minden bizonnyal nagy jelentőségű lehet, klinikai hasznosságuk valószínűleg korlátozott.

6.2.2 Citokinek májbetegségekben. A fémion-koncentrációk összefüggése a szisztémás citokinszintekkel

Számos adat utal arra, hogy a nők érzékenyebbek az alkohol májtoxikus hatásaira [*Lieber és mtsai 19*94]. Nőknél már napi 20 gramm, míg férfiaknál csak napi 30 gramm alkohol krónikus fogyasztása mellett alakul ki májkárosodás. A nemtől függő különbségre számos magyarázat született, így például az, hogy nőknél az alkohol farmakokinetikája, eliminációs sebessége, szöveti eloszlása eltérő [*Baraona és mtsai* 2001, *Frezza és mtsai 19*90], más a metabolizmusért felelős enzimek aktivitása [*Chrostek és mtsai* 2003, *Müller* 2006], fokozottabb a májsejtek érzékenysége a gyulladásos ingerekre [*Dettling és mtsai* 2008, *Thurman és mtsai* 2000]. Számos kísérleti adat és klinikai megfigyelés utal arra is, hogy a májkárosodás kialakulásában a szabad gyökök által kiváltott toxikus hatásokkal, így a szabad gyök indukálta gyulladással szembeni nemtől függő érzékenység is szerepet játszik [*Yamashina és mtsai* 2005]. Az alkohol okozta károsodást nagymértékben befolyásolja, hogy milyen formában kerül elfogyasztásra. Alkoholtartalma ellenére a vörösbor mérsékelt mennyiségben történő fogyasztásával kapcsolatosan számos kedvező biokémiai hatást mutattak ki, aminek a hátterében a vörösbor antioxidáns hatása lehet. Célkitűzésünk az volt, hogy a mérsékelt vörösborfogyasztás szisztémás gyulladásra, a fémionok szintjére és a redox-homeosztázisra gyakorolt hatásait vizsgáljuk egészséges férfiakban és nőkben és elemezzük, hogy ezek a hatások mutatnak-e nemtől való függést.

Vizsgálatunk igazolta, hogy az egy hónapig tartó, a lakosság nagy hányadára jellemző mennyiségben történő mérsékelt vörösborfogyasztás egészséges fiatal egyénekben a szérum citokinszintek, fémionok és antioxidáns-paraméterek esetében nemtől függő módon markáns változásokat idéz elő [*Bekő és mtsai* 2008].

Egyrészt kimutattuk, hogy egészséges fiatal nőknél és férfiaknál egy hónapon keresztül napi 24 g, illetve 36 g alkohol nem okoz májkárosodást. Ez a megfigyelés ellentmond számos korábbi közleménynek, amely felhívta a figyelmet arra, hogy ez a mennyiségű alkohol már egészségre veszélyes lehet. [*Becker és mtsai 19*96, *Bellentani és mtsai 19*97, Snow *és mtsai* 2009] Az ellentétes eredményt talán megmagyarázhatja az, hogy a résztvevők vörösbort fogyasztottak, ami az alkohol mellett számos egyéb, az alkoholos májkárosodás ellen védő bioaktív anyagot is tartalmaz mint a flavonol származékok (katechinek), fenol-karbonsavak és –aldehidek (pl.gallusz-, sziringin-vanillinsavak, sziringin-protokatechualdehidek) és a flavonol származékok, kiemelten a **B** gyűrűn vicinális hidroxilcsoportokat tartalmazók (kvercetin, kvercitrin, miricetin) továbbá a rezverarol [*Rivero-Pérez és mtsai 2007, Kasdallah-Grissa és mtsai* 2007, *Upadhyay és mtsai* 2008]. A rezveratrolról a közelmúltban kimutatták, hogy alkoholos májkárosodás

egérmodelljében meg lehet szüntetni a zsírmájat, valószínűleg az intracelluláris jelátvitelre és zsírmetabolizmusra gyakorolt hatása révén [*Ajmo és mtsai* 2008]. Mivel az általunk használt vörösbor, az Egri Cuvée rezveratrol-tartalma nagy (12,03 mg/l), lehet, hogy ez az egyik olyan tényező, ami megakadályozta a májkárosodás kialakulását.

Annak ellenére, hogy nem észleltünk a májműködésben eltéréseket, markáns változásokat figyeltünk meg a szérum citokinszintek, fémionok és antioxidáns védekezőképesség esetében. A változások jelentős része nemtől függő – nők esetében sokkal kifejezettebb – volt.

Egyik legfontosabb megfigyelésünk, hogy nőknél egy hónapig tartó vörösborfogyasztás mellett egyes citokinek szintje szignifikánsan változik. A gyulladásos citokinek – így a TNFα, IL-1, IL-8 és a májban termelődő többi akut fázis citokin, így az IL-6 – jelentősége alkoholos májkárosodásban ismert. Alkoholos májbetegségben két faktor váltja ki a fokozott citokintermelést: egyrészt nő a szervezet endotoxin-expozíciója, másrészt az alkohol lebontása során szabad gyökök generálódnak és ezek határása aktiválódnak az NF-κB útvonalon keresztül a gyulladásos citokineket termelő gének [*Khoruts és mtsai* 2001, *Mandrekar és mtsai* 2009, *Nanji és mtsai* 1999]. Érdekes módon a szignifikáns citokinszint-változások nem egy irányba mutatnak. A gyulladásos citokinek közül kettőnek (IL-1α és IL-2) a koncentrációja nőtt, az IL-6-szint csökkent, míg a TNFα szintje lényegében nem változott. Eredményeink alapján nem lehet megmondani azt, hogy ez összességében májkárosodás lehetőségére hívja-e fel a figyelmet – mindenesetre az a tény, hogy az egy hónapos vizsgálatot követően a májfunkciós tesztek eredménye nem változott, azt jelzik, hogy a citokinszintek ilyen mértékű és jellegű megváltozásának valószínűleg nincs klinikai jelentősége. Ettől eltekintve azonban az, hogy citokinszint-eltéréseket csak a nőknél figyeltünk meg, jelezheti, hogy az alkohol nemtől függő májkárosító hatásában az eltérő gyulladásos válaszkészségnek szerepe lehet [*Bekő és mtsai* 2008].

A fémionok esetében talán a legfontosabb változásnak az ólomszintek csökkenését tartjuk, ezt a hatást férfiaknál és nőknél egyaránt észleltük. Magas ólomexpozíció esetén ismert, hogy a szabadgyök-képződés fokozódik, ezzel összefüggésben pedig nő a máj, az agy és a vesetoxicitás kockázata. [*Flora és mtsai* 2007, *Hermes és mtsai 19*91, *Hsu és mtsai* 2002]. Ebből a szempontból a vörösborfogyasztás kifejezetten kedvező hatású [*Mudipalli és mtsai* 2007]. A potenciális kedvező hatást jelzi, hogy a vizsgálat során a résztvevőknél az antioxidáns védekezés javult.

Eredményeink alapján természetesen nem lehet megmondani, hogy az ólomszint csökkenése a vörösborban jelen lévő, eddig még nem azonosított anyagnak köszönhető-e. Potenciálisan a sztilbénszármazék rezveratrol és egyéb polifenolos vegyületek jönnek szóba

[*Lavid és mtsai* 2001; *Shalan és mtsai* 2005] Az alumíniumszint esetében észlelt hasonló mértékű csökkenés ezt a kelátor hatást valószínűsíti.

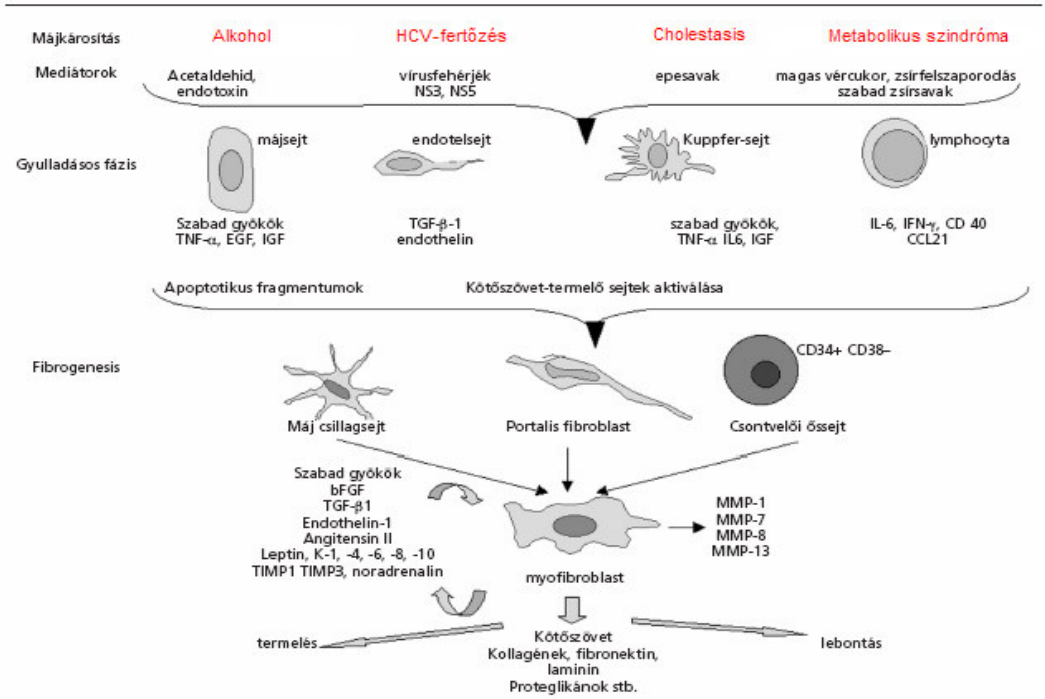
A fémionok szintjének a megváltozásában elméletileg a diéta is szerepet játszhat. Ez a lehetőség különösen a kalcium esetében jön szóba. Bár a résztvevők étrendjét nem elemeztük részleteiben, elképzelhető, hogy a kalciumszint csökkenése annak az eredménye, hogy a rendszeres alkoholfogyasztás miatt csökkent a kalciumban gazdag italok (tej, gyümölcslé) fogyasztása. (Egyik esetben sem jeleztek a résztvevők laktóz intoleranciát, ami szintén ezt a felvetést támasztja alá.) Emellett általánosan ismert, hogy a krónikus alkoholfogyasztás mellett csökken a kalciumbevitel [*Fatma és mtsai* 2004; *Perry és mtsai* 1998], illetve egy egyelőre ismeretlen mechanizmus révén csökken az ionizált és összes kalciumszint [*Diez és mtsai* 1997; *Keiver* 2005]. Vizsgálatunkban a Sr és a Ca parallel módon változott. Mivel a Sr és a Ca fizikokémiai tulajdonságai hasonlóak, illetve a Sr döntően a Ca-mal együtt fordul elő, a Sr-szint csökkenésében valószínűleg ugyanolyan mechanizmus játszik szerepet, mint a Ca-szint csökkenésében.

Eredményeink alapján a fémionok nemtől függő módon változnak [*Bekő és mtsai* 2009]. Nőknél a vizsgálat kezdetekor magasabb a Mg és Zn szint, illetve a Zn/Cu arány a vörösborfogyasztás során csökkent, ezzel szemben férfiaknál ezek nem változtak. Ismert, hogy a Zn és Mg védenek az alkohol indukálta májkárosodással szemben [*Cabré és mtsai* 2001, *Kang és mtsai* 2005, *Poikolainen és mtsai* 2008]. A Zn adása megakadályozza az etanol okozta P450 2E1 aktivitás-fokozódást, illetve fokozza az alkohol metabolizmusát végző alkohol-dehidrogenáz aktivitást. Az intracellularis Zn Fas/FasL-mediált útvonalon keresztül gátolja az alkohol-indukálta májsejt-apoptózist [*Bolkent és mtsai* 2006]. A Zn a glutation-függő és a szuperoxid-dizmutáz antioxidáns kapacitást is fokozza. Eredményeink alapján nem tudjuk megmondani, hogy mi állhat a nemi különbségek hátterében, azonban a Zn- és Mg-szintekben észlelt eltérés szerepet játszhat a nők alkohol iránti fokozott érzékenységében.

Az a megfigyelésünk, hogy a vörösborfogyasztással összefüggésben javult a résztvevőknél az antioxidáns védekezőképesség, a korábbi adatoknak megfelel [*de Gaetano és mtsai* 2003, *Stanley és mtsai* 1999]. Ez részben a vörösvértestek csökkent fémion-koncentrációjával függhet össze. A fémionok és az antioxidáns védelem közötti kapcsolat általánosan ismert, ezt mi is kimutattuk [*Bjelakovic és mtsai* 2008, *Zidenberg-Cherr és mtsai* 2001]. Valószínűleg a nőknél bekövetkező kifejezettebb antioxidáns-státusz javulás a kifejezettebb fémion-szint változásokkal áll kapcsolatban. Az antioxidáns védelem javulásában ezen túl a vörösborban lévő polifenolok, a rezveratrol a favonol származékok (katechinek), fenol-karbonsavak és –aldehidek (pl.gallusz-, sziringin-vanillinsavak, sziringin-protokatechualdehidek) és a flavonol származékok, kiemelten a

B gyűrűn vicinális hidroxilcsoportokat tartalmazók (kvercetin, kvercitrin, miricetin) is szerepet játszhat. (Utóbbinak azonban a nemek közti különbségben elhanyagolható lehet a szerepe, ugyanis a férfiaknál a testtömeg-kilogrammra vonatkoztatva elfogyasztott napi antioxidáns dózis csupán 10%-kal haladta meg a nőknél becsült értéket).

A májfibrózis és májcirrhosis ugyanannak a kórfolyamatnak a különböző állomásai. A májfibrózis esetén a máj kötőszövetesen átépül. Ebben a folyamatban a gyulladás, a májsejtek károsodása, pusztulása egyidőben van jelen. A gyulladás kialakulásában és fenntartásában a gyulladásos citokinek fokozott termelődése központi szerepet játszik (6.2.2.2.A ábra) [*Pinzani és mtsai* 2001, *Tsukamoto és mtsai* 1999].



20. ábra Májkárosító noxa és a citokinválasz közötti kapcsolat [*Pár és mtsai* 2006]

Célkitűzésünk annak az elemzése volt, hogy a fibrózis végállapotát jelentő májcirrhosis esetén mérhető szisztémás citokin-profil változik-e a májcirrhosis etiológiájától függően. Ennek érdekében krónikus alkoholfogyasztás, HCV-fertőzés miatt kialakult cirrhosisban, illetve primer biliáris cirrhosisban szenvedő betegek citokinszintjeit határoztuk meg.

A citokinek központi szerepet játszanak az intrahepatikus immunsejtek és a hepatociták kommunikációjában: egyaránt befolyásolják a sejthomeosztázis szabályozó intracelluláris jelátvivő útvonalakat, illvetve az immunsejtek működését. A veleszületett immunitást alapvetően befolyásoló TNF-α és IL-6 termeléséért a Kupffer-sejtek és a májba került monociták és

makrofágok a felelősek. Ezek a citokinek olyan szignálokat indíthatnak el, melyek eredményeként a májsejtek apoptózisa következhet be, beindulhat a kötőszöveti fibrózis [*Tacke és mtsai* 2009].

A citokintermelődés diszregulációja és a következményes szöveti gyulladás a májsejteket támadó vírusfertőzések, így a HCV esetén egyértelműen jelen van [*Tiegs és mtsai* 2007]. Egyre több adat utal azonban arra, hogy az antigéntől független májbetegségekben is központi szerepe van az ellenőrizetlen immunválasznak. Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy vannak-e olyan specifikus citokinek, amelyek a különböző etiológiájú, vírusos, autoimmun, illetve toxikus eredetű májcirrhosisokban eltérő módon viselkednek.

Eredményeink azt mutatják, hogy bár klinikailag és szövettanilag a cirrrhosis egy végállapot, a patológiás folyamat celluláris szinten korántsem zárult még le, mert mindegyik cirrotikus csoportban az egészséges szintet többszörösen meghaladó IL-6 szinteket észleltünk. Ez az eredmény megfelel az IL-6-nak a máj kötőszövetes átépülésében játszott központi szerepével [*Kershenobich Stalnikowitz és mtsai* 2003].

A cirrotikus betegeken belül a legalacsonyabb citokinszinteket alkoholos eredetű májcirrhosisban szenvedő betegeknél mértük. Bár a betegség kialakulásában a proinflammatorikus citokinek ellenőrizetlen termelődésének az irodalmi adatok alapján fontos szerepe van [*Jeong és mtsai* 2008], a gyulladás jelentősége a HCV-fertőzés, illetve a PBC talaján kialakult májkárosodáshoz képest kisebb. HCV-fertőzés talaján kialakult cirrhosisban az IL-6-szint mellett csak az IL-2-szint emelkedett szignifikánsan. Ez a megfigyelésünk összhangban van azoknak a korábbi vizsgálatoknak az eredményeivel, melyek HCV-fertőzésben és az ennek talaján kialakult cirrhosisban nagyobb IL-2 szérumszinteket igazoltak [*Kasprzak és mtsai* 2004, *Kasprzak és mtsai* 2006].

Az IL-6 mellett a legmagasabb gyulladásos citokinszintek az autoimmun eredetű PBC-ben mérhetőek. Ebben a kórképben az IL-8- és a TNFα-szintek az egészséges referenciaérték többszörösét is elérhetik, illetve az átlagos antiinflammatorikus IL-10-szint az egészségesekben mért érték kevesebb, mint a fele. PBC-ben a magas TNFα-szint ismert [*Jirillo és mtsai* 2002], míg az általunk észlelt kiemelkedő IL-8-szintekről eddig csak igen korlátozott számú irodalmi adat áll rendelkezésre [*Chuang és mtsai* 2006]. Eddig túlnyomórészt csak szövettani vizsgálatok eredménye jelezte, hogy a biliáris sejtekben az IL-8 expressziója összefügghet a betegség súlyosságával és progressziójával. [*Isse és mtsai* 2007].

Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az IL-8-szint emelkedése PBC-ben fontos diagnosztikus jel és esetleg terápiás célpont is lehet. HCV-ben az IL-2 szint

emelkedése karakterisztikus, míg alkoholos eredetű májcirrhosisban a szisztémás gyulladásra utaló jel – a magasabb IL-6 szintek kivételével – nem figyelhető meg.

A Wilson-kór a májban zajló rézmetabolizmus autoszomális recesszív módon öröklődő rendellenessége, aminek az eredményeként a hepatocitákban és egyes extrahepatikus szervekben, így az agyban és a szaruhártyában réz rakódik le. Ennek eredményeként Wilson-kórra a neurodegeneratív betegség és a májbetegség együttes jelenléte a jellemző. A betegségben kialakuló cirrhosis mellett jellegzetes idegrendszeri tünetek (beszédzavar, ataxia, Parkinson-kór- -szerű extrapiramidális tünetek), a szaruhártyában típusos elváltozás (Kaiser-Fleischner-gyűrű) figyelhetők meg. A tünetek azonban nem mindenkinél vannak egyforma mértékben jelen, van, amikor a májelváltozások, és van, amikor az idegrendszeri eltérések dominálnak. A tünetek heterogenitásának az oka nem ismert. Célkitűzésünk annak a vizsgálata volt, hogy különböző domináns tünetek mellett a redoxrendszerek aktivitásában, a fémion-, illetve a citokinszintek esetében van-e különbség, ezek mennyire jellemzőek az egyes Wilson-kór altípusokra olyan betegeknél, akik kelátor-kezelésben részesülnek.

Számos réztartalmú enzim van jelen az agyszövetben, így a dopamin-β-hidroxiláz, vagy a Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz (SOD1). Ezek működése réztúlterhelés mellett megváltozhat. [*Kitzberger és mtsai* 2005]. Mivel a rézen kívül egyéb fémionok szintje is emelkedhet Wilson-kórban, ez a különböző sejtek és szervek, így az idegrendszer károsodásához vezethet. Vizsgálatunk célkitűzése az volt, hogy elemezzük, a rézen kívül egyéb fémionok szintje eltérő-e neurológiai tünetekkel járó Wilson-kóros betegeknél. Mivel ismert, hogy a Fenton-reakció révén a fémionok alapvetően befolyásolják a szabadgyök-képződést, illetve a gyulladásos reakciók intenzitását, vizsgálatunk kapcsán meghatározzuk azt is, hogy neurológiai tünetekkel járó Wilson kórban megváltoznak-e a szisztémás citokinszintek és csökken-e az antioxidáns védelem neurológiai szövődményekben nem szenvedő betegekhez képest.

Kutatásaink eredményei az irodalommal összhangban [*Wiggelinkhuizen és mtsai* 2009] egyértelműen igazolták, hogy krónikus kelátorterápia mellett a szöveti rézszint Wilson-kórban normalizálódik, függetlenül attól, hogy jelen vannak-e az idegrendszeri szövődmények, vagy sem. (A terápia során betegeink 50%-nál a karakterisztikusnak tartott Kaiser-Fleischner gyűrű is eltűnt). A kelátorkezelés ellenére azonban Wilson kórban számos fémion lényegesen meghaladta az egészséges referenciatartomány felső határát. [*Bekő és mtsai* 2009] Ennek számos patofiziológiai következménye lehet. Általánosan ismert ugyanis, hogy a nehézfémek (arzén, kadmium, ólom, higany, nikkel) közvetlen hatást gyakorolnak a mentális viselkedésre. Hatásukra a mentális és központi idegrendszeri funkciók károsodnak. Befolyásolják a neurotranszmitterek termelődését és felhasználását, illetve számos anyagcserefolyamatot [*Maile és mtsai 19*99]. Az

alumínium célszerve a csont, agy, vese és gyomor. Az alumíniummérgezés főbb tünete a bélfalizomzat görcse, demencia, gasztroenteritisz, vesekárosodás, májműködési zavar, izomfájdalom, pszichózis és légszomj és általános gyengeség [*Maile és mtsai* 1999]. Ólommérgezés esetén akut és krónikus központi idegrendszeri károsodás lép fel. Az ólom a fehérjék SH-csoportjait támadja és inaktiválja. Különösen veszélyes a fejlődő agyra, amiben a neruonhálózatok kialakulását gátolja [*Walsh és mtsai* 1984]. A tartós krómexpozíció vese- és májkárosodást vált ki, károsítja a keringést és az idegrendszert is. A báriumtoxicitás klasszikus jele a súlyos hypokalémia, szívritmuszavar, légzési elégtelenség, elhúzódó idegrendszeri diszfunkció, bénulás, myoclonus, magas vérnyomás és súlyos tejsavas acidózis [*Ira és mtsai* 2002].

Vizsgálatunk során kiderült, hogy a neurológiai tüneteket mutató betegeknél szignifikánsan magasabb volt a Li, Pb, Cr és Ni szintje a neurológiai tünetektől mentes betegekhez képest. Ezen elemek idegrendszeri működésre gyakorolt hatása alapján megalapozott azt feltételezni, ezeknek az emelkedett fémionszinteknek jelentősége lehet a Wilson-kórhoz társuló neurológiai szövődmények kialakulásában. Fontos hangsúlyozni azt is, hogy ezek a szintek kelátorkezelés mellett emelkedtek. Ez egyrészt felhívja a figyelmet arra, hogy a ma Magyarországon Wilson-kórban rutinszerűen alkalmazott D-penicillamin mellett egyéb, kelátorok alkalmazása is indokolt lehet. Másrészt jelzi, hogy a kezelés hatékonyságának a monitorozására a rézszintek ellenőrzése mellett egyéb fémionszintek mérésére is szükség lehet.

A fémionszint-emelkedés eredményeként fokozódhat a szabadgyökös reakciók intenzitása. Ezt számos aspektusból vizsgáltuk (antioxidánsvédelem, antioxidáns enzimek aktivitása, citokinszintek), azonban a neurológiai szövődményekkel járó és nem járó Wilson-kór között nem találtunk különbséget. A különbség hiányára két magyarázatot feltételezünk:

(a) Ismert, hogy az idegrendszerben felhalmozódó réz hatására bekövetkező fokozott szabadgyök-terhelés neurodegeneratív folyamatokat indukál [*Rossi és mtsai* 2004, *Strausak és mtsai* 2001]. A D-penicillamin-kezelés során a Cu-szintek alapján történik a betegek gondozása, így elképzelhető, a normalizált Cu-szintek mellett valóban nincs jelen fokozott szabadgyök-terhelés. A többi, Wilson-kórban emelkedett fémionok valószínűleg nem szabadgyök-mediált módon, hanem egyéb mechanizmusok, például egyes kulcsfontosságú enzimek gátlása révén gyakorolnak hatást a sejtműködésre.

(b) Mérőmódszereink a szisztémás szabadgyök-terhelés és az ezzel szembeni védekezés vizsgálatát tették lehetővé. Adataink csak közvetve utalnak a lokálisan kialakuló redox-homeosztázis változásokra [*Bekő és mtsai* 2009].

Ismert, hogy számos neurodegeneratív betegségben a citokinszint megváltozása szerepet játszik [*Rojo és mtsai* 2008, *Shaftel és mtsai* 2008]. Perry és munkatársai megfigyelése szerint az agyban a pro- és antiinflammatorikus citokinek egyensúlyzavara a mikroglia-sejtek aktivációját váltja ki és ez vezet az idegszövet károsodásához [*Perry és mtsai* 2004]. Kezelés előtt álló Wilson-kóros betegeknél egy korábbi vizsgálat [*Goyal és mtsai* 2008] kimutatta, hogy a gyulladásos citokinek, így a TNF-α, IFN-γ és IL-6 szintje emelkedik, ami folyamatosan fennálló gyulladásos reakcióra utal. A szerzők feltételezték, hogy ebben a magasabb rézszinteknek van szerepe.

Munkánk során emelkedett IL-6- és IL-8-szintet találtunk a Wilson-kóros betegeknél, ami alátámasztja, hogy valamilyen ok miatt a kezelt Wilson-kóros betegeknél is szisztémás gyulladás van jelen [*Bekő és mtsai* 2007]. Mivel a vizsgálatunkban részt vevő betegeknél a rézszintet normalizálták, ezért nem valószínű, hogy a fokozott gyulladásért a rézanyagcsere zavara lenne a felelős. A fokozott gyulladásos reakcióban a többi fémion szintjének az emelkedése is szerepet játszhat, habár a citokinszintek és a fémion-szintek között közvetlen kapcsolatot nem mutattunk ki. Érdes módon a neurológiai tünetekkel szövődött Wilson-kór mellett a szisztémás gyulladás intenzitása nem volt magasabb. Ez jelzi, hogy a a gyulladásos citokinek szintjének a mérése nem segít az egyes Wilson-kóros alcsoportok elkülönítésében, viszont nem zárja ki a lokálisan, az idegrendszerben zajló gyulladás lehetőségét.

6.2.3 Citokinek egyéb belgyógyászati kórképekben

Az utóbbi évek vizsgálatai alapján egyértelművé vált, hogy a tumoros betegek redox-homeosztázisa szignifikáns mértékben különbözik az egészséges egyénekétől [*Ristow és mtsai* 2006]. A rák kialakulása és szóródása során a szabadgyökös reakciók és az antioxidáns védekezés közötti egyensúly nagymértékben a szabadgyökös folyamatok irányába tér ki [*Belostotskaya és mtsai* 2005, *Blázovics és mtsai* 2008].

Ez a felismerés vezetett azokhoz a próbálkozásokhoz, melyek célja, hogy az antioxidáns védekezőképesség javítása révén segítsék a rákelleni védekezést.

A cékla (*Beta vulgaris* L. ssp. e*sculenta* var. rubra) kedvező táplálkozás-élettani hatásai bioaktív komponenseinek, a betainnak, betaninoknak, betaxantinoknak, flavonoidoknak, polifenoloknak, vitaminoknak, (tiamin, riboflavin, piridoxin, aszkorbinsav), biotinnak, fólsavnak köszönhetők. Szénhidrátkomponensei a glükóz, fruktóz és a szacharóz, valamint jelentős a pektintartalma is. A céklát a népgyógyászat különféle daganatos betegségek gyógyítására is alkalmazza. Az antioxidáns hatás kialakításában részt vesznek a színanyagok és a fenolos vegyületek is. Irodalmi adatok és saját korábbi kutatásaink alapján tehát feltételeztük, hogy a cékla optimális mértékű fogyasztása hasznos kiegészítője lehet a kemoterápiás kezelésben

részesülő prosztatarákos betegek táplálkozásjavításának. Célkitűzésünk annak a vizsgálata volt, hogy prosztatakarcinómás betegeknél liofilizált céklapor adásakor hogyan változik a redox rendszerek aktivitása, illetve ez milyen hatást gyakorol a szisztémás citokinszintekre és növekedési faktorokra.

Irodalmi adatok, korábbi és jelen kutatásaink eredményei azt mutatták, hogy a szervezetben végbemenő rákos folyamatok a szervezet egészét érintik, annak homeosztázisát befolyásolják [*Nyirády és mtsai* 2009]. Ha az egy hónapig tartó cékla-kezelt, kemoterápiában is részesülő metasztatikus betegek adatait elemeztük, akkor azt tapasztaltuk, hogy általában a proinflammatorikus citokinek szérumszintje tendenciájában csökkent a cékla hatására. Az EGF értéke ellenben szignifikánsan nőtt a kiegészítő kezelés hatására, ami az androgén dependens tumorsejtek proliferációjában jelentős szerepet játszik. Ez a tény felhívja a figyelmet a kezelés potenciális veszélyeire [*Gregory és mtsai* 2004; *Zhu és mtsai* 2008; *Bekő és mtsai* 2009]. E megállapítással kapcsolatban azonban farmakognóziai kutatások is szükségesek lehetnek, mert a céklafajták között szignifikáns különbségek mutathatók ki a biológiailag aktív hatóanyagok koncentrációiban. E területen jelenleg is intenzív kutatásokat folytatunk.

Ha az IL-2 szérumszintjeit betegekre lebontva értékeltük, akkor azt láttuk, hogy az IL-2 a betegek közel felében (44%) emelkedett, ami kedvező hatást jelez [*Bălăşoiu és mtsai* 2005]. Figyelemre méltó volt, hogy az IL-6-, IL-8- és a TNF-alfa-szintek, melyeknek proinflammatórikus aktivitása összefüggést mutat a betegség progressziójával, több betegnél jelentősen csökkent [*Michalaki és mtsai* 2004]. Annak megítéléséhez, hogy a betegek közül kiknek az esetében érvényesül a kedvező hatás, további vizsgálatok végzése és az összefüggések elemzése szükséges.

A Semmelweis Egyetemen folyó régebbi kutatások vastagbél-daganatos betegekben differenciál-diagnosztikai jelentőségűnek találta az vörösvértestek össz-scavenger kapacitásának változását [*Blázovics és mtsai* 2008]. Az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a vizsgálatokhoz korábban kifejlesztett kemilumineszcenciás módszer az álnegatív és álpozitív eseteknél egyértelműen megerősítette a feltételezett diagnózist. A plazma redoxi-státuszának változása és a fémion-koncentrációk meghatározása további bizonyítékot adott a helyes diagnózis felállításához, és a szükséges orvosi beavatkozások tervezéséhez [*Blázovics és mtsai* 2008]. Bár a totál scavenger kapacitás változása az általunk vizsgált populációban nem volt szignifikáns, a tendencia kedvező, amit a plazma Fe-, Se- és Zn-koncentráció és a Zn-protoporfirin szint változásai is megerősítenek. A vörösvértestekben mérhető kötött formaldehid-koncentráció meghatározásai pedig azt sejtették, hogy a szervezet egészét jellemző metil-pool csökkenése szoros korrelációt mutat a tumoros folyamatok súlyosságával [*Blázovics és mtsai* 2008; *Nyirády*

és mtsai 2009]. Ezeknek a megfigyeléseknek a hátterében egy komplex rendszer jelenléte igazolódott.

Az utóbbi két évtizedben igazolták a formaldehid meghatározó szerepét a biológiai rendszerek működésében. A HCHO mindig kötött formában van jelen az élő rendszerekben. A kötéserősség azonban változó. A transzmetilezési reakciók mindig formaldehidet generálnak. A transzmetilezés térszerkezetet módosító szubsztitúciós reakció, fontos szerepet tölt be a fehérjék közötti, ill. a sejten belüli kölcsönhatásokban. Ismert a DNS működést szabályozó metilhisztonok jelentősége és a DNS bázisainak metileződése is [*Baylin* 1998, *Baylin* 2006, *Park* 1990, *Szende* 2001]. Az L-metionin S-metilcsoportjának a képződése HCHO-on keresztül történik. A HCHO képződése az S-adenozil-L-metionin (SAM) S-, metilcsoportjából a legkülönbözőbb enzimatikus transzmetilezési reakciókhoz kapcsolódik [*Huszti* 1986, *Wei* 2007]. A HCHO tehát nélkülözhetetlen molekula a biokémiai reakcióutakon. Kimutatták, hogy bizonyos fehérjék lizin, arginin, hisztidin, glutaminsav, aszparaginsav, láncvégi alanin, prolin, fenilalanin nitrogén atomjain, a cisztein kénatomján és a metionin kén- és nitrogénatomján metileződhet. Azonban szabad metilezett aminosavakat is izoláltak [*Tyihák és mtsai* 1998]. Bizonyították, hogy a transzmetilezési folyamatokhoz Cu ionokra is szükség van. Egy Cu ion négy HCHO molekulát képes szállítani. [*Tyihák és mtsai* 2009]

A protoporfirin IX heterociklusos molekula a protoporfirinogén-oxidáz aktivitásának következtében alakul ki. A molekula a ferrokelatáz hatására tovább alakul hemmé. A hemoglobin bioszintézise részben a citoszolban, részben a mitokondriumban zajlik. A hem és a globin végül a citoszolban kapcsolódik össze. Igazolták, hogy a fehérjén az arginin (38), metionine (65) és a lizin (72) mellett a metionin (80) is metilálódik, így a Fe komplexbe záródik és kialakul a hemoglobin. A H_2O_2/$^{\cdot}OH$ – mikroperoxidáz – luminol kísérleti rendszerünk a tumoros betegek vörösvértestjeiben megjelenő szabad protoporfirin koncentrációjától függően képes fényt generálni. A rákos betegek korai stádiumában jelentkező csökkent CH_3-pool miatt nem képes maradéktalanul kialakulni a hemoglobin, így a szabad protoporfirin a rendszerben lévő oxigén szabad gyökökkel reagálva maga is gyökösödik, és hozzájárul a luminol aminoftálsav átalakulásához, amit kemilumineszcencia kísér. A rákbetegség későbbi stádiumaiban, illetve metasztázisban egyre inkább csökken a szervezet metilcsoport-raktára, így a hemoglobin mellett nemcsak a vas-komplexnél jóval stabilabb Zn-protoporfirin, hanem a szabad protoporfirin szintje is jelentősen megnő. Ekkor a nagy koncentrációban kimutatható protoporfirin már antioxidánsként viselkedik, és gátolja a Fenton-reakciót, ezért kevesebb hidroxilgyök keletkezik vas jelenlétében a vizsgálati rendszerben lévő hidrogén-peroxidból, így az oxigén szabad gyökök

scavengelése miatt a luminol nem bomlik el a vizsgálati idő alatt, és a műszer szignifikánsan kis fényintenzitást detektál [*Blázovics és mtsai* 2009]

Amennyiben egy táplálék-kiegészítő készítmény metil-donor vegyülete(i) növelik a szervezet metilcsoport-készletét, úgy a vörösvértestekben egyre nagyobb az esély a hemoglobin koncentrációjának növekedésére és a szervezet oxigén-ellátottságának helyreállítására, vagyis a rákos folyamat progressziójának mérséklésére, illetve a beteg életminőségének javítására. Tehát a redox-homeosztázist jellemző totál scavenger kapacitás (az indukálható kemilumineszcencia reciproka) és a transzmetilezési folyamatokból származó HCHO dimedon adduktként történő meghatározása együttesen jó hatásokkal jelzik a tumoros folyamatok stádiumát, és felhívják a figyelmet az esetleges ál-pozitív vagy ál-negatív PSA értékekre, valamint képes a kezelések hatásának lemérésére, így nagyobb biztonsággal kezelhető a prosztatarákos beteg. A kezelésnek jelentős gyulladásgátló hatásai lehetnek, viszont nőhet bizonyos proliferációt elősegítő vegyületek szintje is. Ezért rendkívül fontosnak tartjuk a táplálék-kiegészítők orvosi kontroll alatt történő, személyre szabott alkalmazását, mert a sokkomponensű készítmények esetében nehezen ítélhető meg egy kiragadott vegyület, esetünkben a betain hatása, mivel számos más bioaktív ágens koncentrációviszonyai szignifikánsan torzíthatják a várt kedvező hatást.

A krónikus betegségekhez kapcsolódó senyvesztő állapot (protein-energy wasting – fehérje-energia hiányos állapot) és a gyulladás közötti kapcsolat tartós dialízisen lévő betegek esetében jól ismert [*Kaizu és mtsai* 2003]. A gyulladás az urémiás kachexia egyértelmű rizikófaktora; a C-reaktív-protein-szint a zsírszövet mennyiségében később kialakuló csökkenésnek független prediktora. A gyulladás és a malnutríció közötti szoros kapcsolat alapján határozták meg az elmúlt évek során a malnutríció-gyulladásos komplex szindrómát (MICS). A MICS kedvezőtlenül befolyásolja a veseelégtelenségben szenvedő betegek prognózisát. Több megfigyelés szerint szoros kapcsolatban áll az ateroszklerózis fokával mind dialízis előtt álló [Stenvinkel *és mtsai* 1999] mind dializált betegeknél [*Stenvinkel és mtsai* 2000, *Wang és mtsai* 2005]. MICS fennállása esetén beszámoltak az erythropoietin hatásának a csökkenéséről [*Kalantar-Zadeh és mtsai* 2003, *Locatelli és mtsai* 2006], a betegek fokozott morbiditásáról és mortalitásáról is [*Lopez és mtsai* 2007]. Célkitűzésünk vesetranszplantált betegek körében a malnutríciós-gyulladásos pontérték (Malnutrition Inflammation Score, MIS) és a gyulladásos citokinszintek közötti kapcsolat elemzése, vesetranszplantált betegeknél a MICS kockázatának felmérése.

A korábbi vizsgálatok alapján a tartós dialízisen lévő betegek között igen gyakori a protein-energiahiányos állapot és a gyulladás együttes előfordulása [*Kalantar-Zadeh és mtsai* 2001], ezért ezt az állapotot ’malnutríciós – gyulladásos komplex szindrómának’ (‘malnutrition-

inflammation complex syndrome' (MICS)) nevezik. A MICS összefügg az oxidatív stressz [*Pou és mtsai* 2007], az eritropoietin rezisztencia [*Agarwal és mtsai* 2008, *Locatelli és mtsai* 2006], a morbiditás és mortalitás [*Kalantar-Zadeh és mtsai* 2004; *Molnár és mtsai 2007*] mértékével. Vizsgálatunk célja annak az elemzése volt, hogy a MIS pontozóskála (Malnutrition Inflammation Score) mennyire megbízható eszköz MICS felmérésére vesetranszplantált betegek körében.

Jelenleg nem tisztázott, hogy mi a legjobb módszer krónikus vesebeteg populációban a MICS meghatározására [*Rambod és mtsai* 2008]. Az utóbbi években dializált betegek körében egyre több vizsgálatban alkalmazták a Kalantar-Zadeh *és mtsai* által kifejlesztett MIS-t [2001]. A közelmúltban egy tanulmányban a MIS skálát referencia eszközként használták a tápláltsági állapot leírására hemodializált betegek körében [*Yamada és mtsai* 2008] Jelenleg a MICS meghatározására a MIS pontszámot egyre általánosabban elfogadják krónikus vesebetegek esetében.

Vizsgálatunkban a MIS értékek megoszlása a mások által közölthöz hasonló volt [*Kalantar-Zadeh és mtsai* 2004], bár a MIS középértéke alacsonyabb volt, ami arra utal, hogy a MICS transzplantált betegeknél kevésbé súlyos formában van jelen, mint dializáltaknál.

Felmérésünkben a MIS mellett több citokint (IL-6, TNF-α), leptint, illetve laboratóriumi paramétereket: pre-albumin, CRP, albumin, transzferrin szinteket is meghatároztunk, illetve mértük és kiszámoltuk az antropometriai változókat is. Irodalmi adatok szerint a leptin, IL-6, TNF-α és többi mért paraméter megbízhatóan jelzi a fehérje-energiahiányos állapotot [*Mak és mtsai* 2006; *Kalantar-Zadeh és mtsai* 2004]. Elemzéseinkben szignifikáns összefüggést találtunk a MIS és a vizsgált citokinek, illetve tápláltsági állapotot jelző paraméterek között, hasonlóan a dializált betegeknél közöltekhez [*Kalantar-Zadeh és mtsai* 2004].

Hipotézisünk az volt, hogy a MIS a gyulladást és az alultápláltságot együttesen jelzi, azaz, hogy a MIS voltaképpen a MICS-t méri. Ezt hipotézist "strukturális egyeneletek modellezese" (Structural Equation Model, SEM) módszerrel vizsgáltuk. A SEM egy olyan statisztikai eljárás, ami ok-okozati kapcsolatok becslését teszi lehetővé statisztikai adatok és feltételezett kvalitatív ok-okozati kapcsolatok alapján és így alkalmas arra, hogy egy adott feltételezést (azaz, hogy a MIS elméletben feloszthatő egy malnutríciót és egy gyulladást mérő faktorra, latens változóra) teszteljünk és elemezzük, hogy mennyire illeszkedik az így számított modell, milyen mértékben felel meg a tanulmány során gyűjtött aktuális adatoknak. A modell lehetővé teszi a latens (azaz közvetlenül nem mért, de becsült) változók hatásának elemzését, becslését is [*Remport és mtsai* 2009].

Az alkalmazott modell esetében a két latens változót tartalmazó SEM mutatta a legjobb illeszkedést, ami megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a MIS egy malnutríciós és egy

gyulladásos komponenst is mér. Míg a regressziós modellekben feltételezzük, hogy a magyarázó változókat hibamentesen mértük, a SEM modellben a változók mérési hiba-faktora szerepel a modellben. Az ábrán jelzett hiba értékek (e1 – e7) ezeknek a mérési hibafaktoroknak felelnek meg (19. ábra). A mért változók és a nem mért latens változók közötti nyilak feletti számok standardizált regressziós koefficienseknek tekinthetők. Ahogy a 19. ábra is mutatja, feltételezésünk szerint egyes változók, így a pre-albumin szintje, a haskörfogat és a leptinszint mind a két latens faktorral összefügg. A CRP, IL-6 és TNF-α szintek csak a gyulladásos latens faktorral vannak kapcsolatban. A CRP esetében például a gyulladással való kapcsolat mértékét a 0,67 standardizált regressziós koefficiens jelzi. A kétirányú nyilak és az ennek megfelelő értékek a korrelációs koefficienseket mutatják. Az alultápláltsági és gyulladásos látens faktorok egymással, illetve a MIS értékkel is összefüggtek. A szövegdobozok feletti számok a többszörös korrelációs értékeket jelzik, azaz azt, hogy a latens változók esetében az adott változó milyen mértékben járul hozzá a varianciához.

Ismereteink szerint ez az első olyan vizsgálat, amely vesetranszplantált betegek esetében a MICS meghatározására a MIS-t alkalmazta. Munkánk erőssége, hogy nagyszámú beteg bevonásával sikerült egy olyan teoretikus modellt kidolgozni, amiben a klinikai paramétereket, a gyulladásos faktorokat és a tápláltsági állapotot együttesen lehet értékelni és egymás közötti kapcsolatukat meghatározni. [*Molnár és mtsai* 2009]

Eredményeink azt mutatják, hogy a MIS érték megbízhatóan jelzi a MICS jelenlétét vesetranszplantált betegeknél. Ez lehetővé teszi, hogy a MICS fennállását könnyen és olcsón lehessen vizsgálni ennél a betegcsoportnál, anélkül, hogy drága laboratóriumi vizsgálatokra volna szükség . A MIS ezen túl a kutatást is segítheti, alkalmazásával a MICS előfordulási gyakorisága nagy betegpopuláción gyorsan meghatározható.

Tézisek

1. A multiplex citokinszint-mérő rendszerekkel mért analitok szintje esetenként nagymértékben eltérő lehet, ezért a metodikai repertoár kiválasztása és konzekvens használata rendkívül fontos. A vizsgálatot végző laboratórium mérőmódszerenként külön-külön kell megállapítsa az egészséges referenciaértékeket.

2. Aszfixiás újszülötteknél a gyulladásos citokinek szintje a posztnatális kor előrehaladtával és hipotermia mellett alacsonyabb.

3. Alacsony endogén kortizolszint esetén a gyulladásos citokinek szintje nő koraszülötteknél és posztaszfixiás újszülötteknél.

4. Az újszülöttkori szepszis diagnózisát segíti, ha az antibiotikus kezelés megkezdése előtt levett vérmintában a prokalcitonin és CRP szintek mellett az IL-8 szint mérésére is sor kerül.

5. Nőknél az alkohol májkárosító hatásai iránti fokozott érzékenységben a krónikus alkoholfogyasztás mellett bekövetkező citokinszint-változás szerepet játszhat. A vörösborfogyasztás hatást gyakorol egyes fémionok szintjére és az antioxidáns védelemre.

6. Alkoholos eredetű, illetve HCV-fertőzés okozta májcirrhosisban, valamint primer biliáris cirrhosisban (PBC) az IL-6-szintnő. PBC-re a magas IL-8 szint, HCV-fertőzés miatt kialakult cirrhosisra a magas IL-2 szint a jellemző.

7. Wilson-kórban kelátorral kezelt betegeknél a magasabb IL-6 és IL-8 szint alapján szisztémás gyulladás van jelen. A neurológiai tünetek függetlenek a citokinszintektől. Wilson-kóros betegeknél számos fémion szintje nő, aminek szerepe lehet a szövődmények kialakulásában.

8. Áttétes prosztatakarcinómás betegekben antioxidánsban gazdag cékla fogyasztásakor a gyulladásos citokinek szintje csökken. Egyben bizonyos növekedési faktorok szintje nőhet, ami miatt ezeknél a betegeknél fokozott óvatosság indokolt.

9. Vesetranszplantált betegeket vizsgálava azt találtuk, hogy az általános állapot, az IL-6 és TNF-α szint és más gyulladásos markerek alapján a malnutríciós-gyulladásos pontérték (MIS) megfelelően jelzi a malnutríciós-gyulladásos komplex szindróma fennállását veseelégtelen betegeknél.

Összefoglalás

Ph.D. munkám során a laboratóriumban olyan rendszereket honosítottam meg, melyekkel egyidejűleg több citokin szintjét lehet meghatározni. Összehasonlító méréseink alapján a különböző rendszerekkel mért analitok szintje esetenként eltér. Ezért mérőmódszerenként külön-külön kell megállapítani az egészséges referenciaértékeket, illetve, egy adott vizsgálatsorozat során egy adott módszerrel kell mérni a citokinszinteket.

Meghatározásainkat olyan kórképekben végeztük el, amelyek kapcsán valószínűsíthető volt a citokin kaszkád érintettsége. A vizsgálatok egy részében a gyulladásos reakciót alapvetően meghatározó szabadgyök-homeosztázisra és az ezzel kapcsolatban álló fémion-szintekre jellemző paramétereket is mértük.

Perinatális vizsgálataink kimutatták, hogy posztaszfixiás újszülötteknél a gyulladásos citokinek szintje a posztnatális kor előrehaladtával, illetve terápiás hipotermia mellett csökken. Ebben az időszakban a szisztémás citokinszinteket a mellékvesefunkció alapvetően befolyásolja: alacsony endogén kortizolszint esetén a gyulladásos citokinek szintje nő. További megállapításunk, hogy az újszülöttkori szepszis diagnózisában segítség lehet az a prokalcitonin és CRP szintek mellett az IL-8 szint mérése is.

Hepatológiai vizsgálataink kapcsán kimutattuk, hogy nőknél a mérsékelt, de krónikus alkoholfogyasztás mellett kifejezettebb citokinszint-változások következnek be. A krónikus vörösborfogyasztás ezen túl nemtől függő hatást gyakorolhat egyes fémionok szintjére és az antioxidáns védelemre is. Májcirrhosisban kimutattuk, hogy a betegség oka befolyásolja a citokinprofilt; primer biliaris cirrhosisra magas IL-8 szint, HCV-fertőzésre magas IL-2 szint a jellemző. Wilson-kóros betegeknél a magasabb IL-6 és IL-8 szint alapján szisztémás gyulladás van jelen, de a neurológiai tünetek függetlenek a citokinszintektől. Egyúttal viszont számos fémion szintje is nő, aminek szerepe lehet a szövődmények kialakulásában.

Prosztatakarcinómában antioxidáns étrendkiegészítő hatására a gyulladásos citokinek szintje csökken. Emellett viszont a növekedési faktorok szintje nő, ezért ilyen betegségben fokozott óvatosság indokolt. Vesetranszplantált betegeknél az általános állapot, az IL-6 és TNF-α szintek alapján a malnutríciós-gyulladásos pontérték megfelelően jelzi a malnutríciós-gyulladásos komplex szindróma fennállását.

Vizsgálataink alapján a multiplex citokinszintek meghatározásra alkalmas rendszerek, redox-homeosztázis és fémion-profil meghatározás segíthetnek az egyes kórfolyamatokban kitüntetett szerepet játszó faktorok azonosítására, esetleg diagnosztikus markerek és/vagy terápiás célpontok kijelölésére.

Summary

During my Ph.D. work I introduced complex systems into the laboratory that enable us to determinate simultaneously the level of several cytokines. Our measurements indicated that the results obtained by different systems may differ; therefore reference ranges should be established for each systems and one kind of system should be used in one experiment.

We performed our studies in disorders with probable involvement of cytokine cascade. In some instances we also determined parameters of free-radical homeostasis and trace element levels that are strongly associated with systemic inflammation.

In perinatal disorders we found that proinflammatory cytokines may decrease with postnatal age and hypothermia in postasphyxiated neonates. Systemic cytokine levels determined are also affected by adrenal function, as level of inflammatory cytokines may increase in the presence of low cortisol levels. In another study we found that the diagnosis of perinatal sepsis may be improved by IL-8 determination in addition to procalcitonin and CRP measurements.

Our hepatological studies demonstrated that the gender-dependent difference in alcohol induced hepatopathy may be attributed, at least partly, to increased cytokine production after chronic alcohol consumption. Red wine consumption may have an impact on the level of some trace elements and antioxidant defense. In liver cirrhosis we demonstrated that cirrhosis of different origins are characterized by specific cytokine-profiles; i.e. extremely high IL-8 and IL-2 levels are present in PBC and HCV-infection, respectively. In patients with Wilson's disease a systemic inflammation is present, supported by high IL-6 and IL-8 levels. Neurological signs and symptoms are independent of cytokine levels. The levels of a number of trace elements are increased that may contribute to complications.

In patients with prostate cancer proinflammatory cytokine levels decrease on administration of a specific antioxidant supplement. The treatment, however, may also increase some growth factors that warrants caution. According to clinical signs and symptoms and IL-6 and TNF-α levels the malnutrition-inflammatory score (MIS) reflects reliably the presence of malnutrition-inflammatory complex syndrome (MICS) in patients after renal transplantation: this finding is of clinical importance when subjects at risk for MICS are to be identified.

Our results indicate that the use of systems suitable for simultaneous detection of cytokine levels, redox homeostasis and trace-element profile may help to identify specific factor in the pathomechanism of immune-mediated disorders and, possibly, may contribute to recognize diagnostic markers and/or therapeutic targets.

Irodalomjegyzék

1. Abbas AK, Lichtman AH. (2003) Cellular and molecular biology, 5th Edition, Saunders, Philadelphia
2. Agarwal R, Davis JL, Smith L. (2008) Serum albumin is strongly associated with erythropoietin sensitivity in hemodialysis patients. Clin J Am Soc Nephrol 3:98-104.
3. Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. (2008) Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 295:833-842.
4. Akisu M, Huseyinov A, Yalaz M, Cetin H, Kultursay N. (2003) Selective head cooling with hypotermia suppresses the generation of platelet-activating factor in cerebrospinal fluid of newborn infants with perinatal asphyxia. Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids 69:45-50
5. Aly H, Khashaba MT, El-Ayouty M, El-Sayed O, Hasanein BM. (2006) IL 1beta, IL 6 and TNF alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. Brain Dev 28:178-182
6. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL. (2000) Infection and preterm birth. Am J Perinatol 17: 357-365.
7. Arnon S, Litmanovitz I. (2008) Diagnostic tests in neonatal sepsis. Curr Opin Infect Dis.21:223-227.
8. Azzopardi D, Brocklehurst P, Edwards D, Halliday H, Levene M, Thoresen M, Whitelaw A; TOBY Study Group. (2008) The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxia encephalopathy: A randomized controlled trial. BMC Pediatr 30:17.
9. Azzopardi D, Edwards AD (2007) Hypothermia. Semin Fetal Neonatal Med;12:303 310.
10. Bălăşoiu M, Turculeanu A, Avrămescu C, Comănescu V, Simionescu C, Mogoantă L. (2005) Cytokines levels in prostate adenocarcinomas. Rom J Morphol Embryol. 46:179-182.
11. Baraona E, Abittan CS, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G, Chayes ZW, Schaefer C, Lieber CS. (2001) Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. Alcohol Clin Exp Res 25:502-507.
12. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res 72:141-196.

13. Baylin SB, Ohm JE. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer 6:107-116.
14. Becker U, Deis A, Sørensen TI, Grønbaek M, Borch-Johnsen K, Müller CF, Schnohr P, Jensen G. (1996) Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. Hepatology 23:1025-1029
15. Beilin B, Yehuda S, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H. (1998) Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses Anesthesiology 89: 1133-1140
16. Beishuizen A, Vermes I, Hylkema BS, Haanen C. (1999) Relative eosinophilia and functional adrenal insufficiency in critically ill patients. The Lancet 353: 1675
17. Bekő G, Ostovits J, Visnyei Zs, Szalay F, Sátori A, Blázovics A, Szentmihályi K. (2009) Significant difference in the concentration of Special metal elements in Wilson's disease with different symptoms during penicillamine treatment Trace elements in the food chain 3: 31-35.
18. Bekő G, Csák T, Hagymási K,Osztovits J, Visnyei Zs, Bányai É, Blázovics A. (2007) The change in the levels of cytokines and growth factors in healthy young adults after regular red wine consumption. Z Gastroenterol 45: pp 438.
19. Bekő G, Hagymasi K, Szentmihalyi K Biro E, Osztovits J, Szalay F, Bárkovits S, Blazovics A. (2008) How can nutritional factors modify the cytokine pattern and redox parameters in alcoholic drink consumption women? Clin Chem Lab Med, 46, S351
20. Bekő G, Hagymási K, Szentmihályi K Stefanovits Bányai É, Osztovits J, Fodor J, Fehér J, Blázovics A. (2009) Sex-dependent alterations in erythrocyte trace element levels and antioxidant status after one month of moderate daily red wine consumption. Eur J Gastroenterol HepatolSep 25. [Epub ahead of print]
21. Bekő G, Krkos K, Rácz K Patócs A, Tulassay Zs. (2008) A szérum inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) referenciatartományának vizsgálata. Magyar Belorvosi Archivum 5: 400-405
22. Bekő G, Osztovics J, Visnyei Z, Csák T, Blázovics A, Kovács M, Szalay F. (2008) Different cytokine patterns in alcoholic cirrhosis, MCV-related cirrhosis and primary biliary cirrhosis. Z. Gastroenterol. 46, 488.
23. Bekő G, Osztovits J, Visnyei Z, Csák T, Blázovics A, Sátori A, Szalay F. (2008) Biochip citokin- és növekedési faktor protein array vizsgálatok különböző etiológiájú májcirrhosisban. Magyar Belorvosi Archivum 3:45.

24. Bekő G, Osztovits J, Visnyei Z., Szalay F., Sátory A,. Blázovics A, Szentmihályi K. (2009) Significance of measurement and difference of special metal elemens in Wilson's disease during penicillinamin treatment. Clin chem Lab Med; 47: s276
25. Bekő G, Visnyei Zs, Osztovits J, Csák T, Szalay F, Czabai G. Bárkovits S., Blázovics A. (2007) Penicillamin-kezelt Wilson-kóros betegek redox-státusa. MSZKT konferencia, Pécs. október 11-13
26. Bekő G. (2008) Biochip technika a labordiagnosztikában, citokinmérések. Orvosképzés 4: 309-312
27. Bekő G., Bíró E., Kovács M., Mátrai B. (2008) Újabb citokin mérési módszerek a labordiagnosztikában A citokin és növekedési faktor panelek értéke Klin. Kísérl. Lab. Med. 34: 41.
28. Bekő G**,** Blázovics A, Szentmihályi K, Bíró E, Romics I, Nyirády P. Biochip cytokine pattern in early prosate cancer. XVIII. International Semmelweis Symposium of Urology 2009 , UroOnkológia 2009; 4, pp. 23
29. Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, Saveria Crocè L, Sasso F, Pozzato G, Cristianini G, Brandi G. (1997) Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. Gut 41:845-850
30. Bender L, Thaarup J, Varming K, Krarup H, Ellermann-Eriksen S, Ebbesen F. (2008) Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. Danish Medical Bulletin 55: 219-23
31. Bennett N, Gabrielli A. (1999) Hypotension and adrenal insufficiency. J Clin Anesth 11: 425-430
32. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. (2008) Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. Cochrane Database Syst Rev.2:CD007176.
33. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells Nature 385 (6618): 729–33.
34. Blázovics A, Fébel H, Székely E ., Bekő G, Szóke E, Szentmihályi K, Sárdi É. (2008) Effect of high resveratrol content red wine versus ethanol on homeostasis in rats. Z. Gastroenterol.46: 489

35. Blázovics A, Kovács A, Lugasi A, Hagymási K, Bíró L, Fehér J. (1999) Antioxidant defence in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn's disease and ulcerative colitis: A chemiluminescent study, Clin. Chem, 45;6:895-896.
36. Blázovics A, Szilvás A, Székely G, Tordai E, Székely E, Czabai G, Pallai Z, Sárdi E. (2008) Important bioactive molecules of erythrocytes in colorectal cancer patients after colectomy. Open Med Chem J, 2:6-10.
37. Blázovics A, Szilvás Á, Székely Gy, Székely E, Bekő G, Barkovits S, Sárdi É. (2008) Measuring of redox homeostasis, bounded HCHO and protoporphyrine concentrations of erythrocytes help us to predict early metastasis. Clin Chem Lab Med 46: S51
38. Blázovics, Hagymási K, Blazics B, Balázs A, Bekő G. (2009) Jelentkezik-e szex-függő eltérés az immunreakciókban kismértékű tartós vörösborfogyasztás alkalmával? XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus 2009 , Gyógyszerészet 11, pp 17: S79

39. Bokodi Géza Miklós (2007) Genetikai polymorphismusok szerepe a bronchopulmonális dysplasia és a perinatális tüdőkárosodás kialakulásában. Ph.D. disszertáció, Budapest, Semmelweis Egyetem
40. Bolkent S, Arda-Pirincci P, Bolkent S, Yanardag R, Tunali S, Yildirim S. (2006) Influence of zinc sulfate intake on acute ethanol-induced liver injury in rats. World J Gastroenterol 12:4345-4351.
41. Bracci R, Buonocore G. (2003) Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. Biol Neonate, 83:85-96.
42. Brunner E, Domhof S, Langer F. (2002) Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. Wiley, New York
43. Buonocore G, De Filippo M, Gioia D, Picciolini E, Luzzi E, Bocci V, Bracci R. (1995) Maternal and neonatal plasma cytokine levels in relation to mode of delivery. Biol Neonate. 68:104 – 110
44. Burke C. (2009) Perinatal sepsis. J Perinat Neonatal Nurs. 23:42-51.
45. Buttram SD, Wisniewski SR, Jackson EK, Adelson PD, Feldman K, Bayir H, Berger RP, Clark RS, Kochanek PM. (2007) Multiplex assessment of cytokine and chemokine levels in cerebrospinal fluid following severe pediatric traumatic brain injury: effects of moderate hypotermia. J Neurotrauma 24:1707-1718.
46. Cabré M, Camps J, Ferré N, Paternáin JL, Joven J. (2001) The antioxidant and hepatoprotective effects of zinc are related to hepatic cytochrome P450 depression and

metallothionein induction in rats with experimental cirrhosis. Int J Vitam Nutr Res.71:229-236.

47. Callaway CW, Rittenberger JC, Logue ES, McMichael MJ. (2008) Hypotermia after cardiac arrest does not alter serum inflammatory markers. Crit Care Med 36:2607-2612.
48. Cavaillon JM (2001) Pro- versus antiinflammatory cytokines: myth or reality. Cell Mol Biol. 47:695-702.
49. Chiesa C, Signore F, Assumma M, Buffone E, Tramontozzi P, Osborn JF, Pacifico L. (2001) Serial measurements of C-reactive protein and interleukin – 6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. Clin Chem. 47:1016 – 1022
50. Chisolm JJ, Jr. Brown DH. (1975) Micro-scale photofluorometric determination of "free erythrocyte porphyrin" (Protoporphyrin IX). Clin Chem 21:1669-1682.
51. Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, Puchalski Z. (2003) Gender-related differences in hepatic activity of alcohol dehydrogenase isoenzymes and aldehyde dehydrogenase in humans. J Clin Lab Anal 17:93-96.
52. Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. (2006) Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. J Autoimmun. 26:232-240.
53. Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC. (2003) IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. Immunol Lett. 86:123-129.
54. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. (1999) IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. J Immunol.162:6233-6237.
55. Dammann O, Leviton A, Gappa M, Dammann CE. (2005) Lung and brain damage in preterm newborns, and their association with gestational age, prematurity subgroup, infection/inflammation and long term outcome. BJOG, 112: S4-9
56. Dammann O, Leviton A. (1997) Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. Pediatr Res 42:1–8
57. Dayer JM. (2002) Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra. Clin Exp Rheumatol. 20:S14-20
58. De Gaetano G, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L. (2003) The mediterranean lecture: wine and thrombosis--from epidemiology to physiology and back. Pathophysiol Haemost Thromb. 33:466-471.

59. Delespesse G, Demeure CE, Yang LP, Ohshima Y, Byun DG, Shu U. (1997) In vitro maturation of naive human CD4+ T lymphocytes into Th1, Th2 effectors. Int Arch Allergy Immunol. 113:157-159.
60. Desplat-Jego S, Bardin N, Larida B, Sanmarco M. (2007) Evaluation of the bioplex 2200 ANA screen for the detection of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods Ann. N.Y. Acad. Sci. 1109: 245–255.
61. Dettling A, Witte S, Skopp G, Graw M, Haffner HT. (2008) A regression model applied to gender-specific ethanol elimination rates from blood and breath measurements in non-alcoholics. Int J Legal Med. Oct 7.
62. Diez A, Serrano S, Cucurull J, Mariñoso L, Bosch J, Puig J, Nogués X, Aubia J. (1997) Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecularbone in Sprague-Dawley rats. Calcif. Tissue Int. 61: 168-171.
63. Dinarello CA. (1998) Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. Int Rev Immunol. 16:457-499.
64. Dinarello CA. (2000) Proinflammatory cytokines. Chest. 118:503-508.
65. Dinya E.(2007) Biometria az orvosi gyakorlatban 2. kiadás Medicina, Medicina Budapest
66. Døllner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Austgulen R. (2001) Inflammatory mediators in umbilical plasma from neonates who develop early-onset sepsis. Biol Neonate 80:41-47.
67. Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, O'Neill LA (2001). "Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family". *Trends Immunol.* **22** (10): 533–6.
68. Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. (1999) Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. Pediatrics 103:766-771.
69. Erdei G, Tóth P, Vásárhelyi B (2003) Új klinikai entitás a perinatológiában: a magzati gyulladásos válaszreakció szindróma. Orvosi Hetilap, 144:1515-1519.
70. Fairchild KD, Singh IS, Patel S, Drysdale BE, Viscardi RM, Hester L, Lazusky HM, Hasday JD. (2004) Hypotermia prolongs activation of NF-kappaB and augments generation of inflammatory cytokines. Am J Physiol Cell Physiol 287:C422-431.
71. Fairchild KD, Viscardi RM, Hester L, Singh IS, Hasday JD. (2000) Effects of hypotermia and hypertermia on cytokine production by cultured human mononuclear phagocytes from adults and newborns. J Interferon Cytokine Res 20:1049-1055.
72. Fatma M. El-Demerdash. (2004) Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. J Trace Elements Med Biol 18:113-121.

73. Fehér A, Olajos F, Nobilis A, Novák M, Bekő G (2009) Monitoring of procalcitonin and C-reactive protein level of prematures and newborns in the early stage of their lives. Clin Chem Lab Med 47: S223.

74.Fernandes D, Duma D, Assreuy J. (2008) Steroids and nitric oxide in sepsis. Front Biosci 13:1698-1710.

75. Fernandez EF, Watterberg KL. (2009) Relative adrenal insufficiency in the preterm and term infant. J Perinatol.29:S44-49

76. Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. (2005) Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology, Clinical Chemistry.51:1165-1176.

77. Flora SJ, Flora G, Saxena G, Mishra M. (2007) Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. Cell Mol Biol.53:26-47

78. Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. (1990) High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. N Engl J Med. 322:95-99.

79. Gergely J, Erdei A. Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest 1998: 32-201

80. Gersbeck N, Schönbeck F, Tyihák E. (1989) Measurement of formaldehyde and its main generators in Erysiphe graminis infected barley plants by planar chromatographic techniques. J Planar Chromatogr 2:86-89.

81. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. (1998) The fetal inflammatory response syndrome. Am J Obstet Gynecol, 179: 194-202.

82. Goyal MK, Sinha S, Patil SA, Jayalekshmy V, Taly AB. (2008) Do cytokines have any role in Wilson's disease? Clin Exp Immunol. 154: 74–79.

83. Gregory CW, Fei X, Ponguta LA, He B, Bill HM, French FS, Wilson EM. (2004) Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. J Biol Chem. 279:7119-7130.

84. Grow J, Barks JD. (2002) Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. Clin Perinatol 29:585-602

85. Gundersen Y, Vaagenes P, Pharo A, Valø ET, Opstad PK. (2001) Moderate hypothermia blunts the inflammatory response and reduces organ injury after acute haemorrhage. Acta Anaesthesiol Scand. 45:994-1001.

86. Haas H, Falcone FH, Holland MJ, Schramm G, Haisch K, Gibbs BF, Bufe A, Schlaak M. (1999) Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. Int Arch Allergy Immunol. 119:86-94.

87. Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. (1988) Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging effects, Chem Pharm Bull, 36;2090-2097.
88. Heckmann M, Wudy SA. (2001) [Adrenal function in very preterm infants in the early postnatal period] Klin Padiatr.213:307-313
89. Hermes-Lima M, Pereira B, Bechara EJ. (1991) Are free radicals involved in lead poisoning? Xenobiotica.21:1085-1090
90. Hsu PC, Guo YL. (2002) Antioxidant nutrients and lead toxicity. Toxicology.180:33-44.
91. Huszti S, Tyihák E. (1986) Formation of formaldehyde from S-adenosyl-L-(mehyl-3H) methionine during enzymatic transmetilation of histamine. FEBS Letters 209:362.
92. Ira A, Taddeo JJ, Kelly K Valenziano C. (2002) Poisoning as a result of barium styphnate explosion. Am J Ind Med. 41:285-288.
93. Isse K, Harada K, Nakanuma Y. (2007) IL-8 expression by biliary epithelial cells is associated with neutrophilic infiltration and reactive bile ductules. Liver Int. 27:672-680.
94. Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P. (2007) Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. Cochrane Database Syst Rev 17:CD003311
95. Jeong WI, Gao B. (2008) Innate immunity and alcoholic liver fibrosis.J Gastroenterol Hepatol. 23:S112-118.
96. Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, Piccigallo E, Amati L, Lembo A, Kalis C, Gumenscheimer M. (2002) The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. J Endotoxin Res. 8:319-327.
97. Kaizu Y, Ohkawa S, Odamaki M, Ikegaya N, Hibi I, Miyaji K, Kumagai H. (2003) Association between inflammatory mediators and muscle mass in long-term hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 42:295-302.
98. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Humphreys MH, Block G. (2004) Comparing outcome predictability of markers of malnutrition-inflammation complex syndrome in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 19:1507-19.
99. Kalantar-Zadeh K, McAllister CJ, Lehn RS, Liu E, Kopple JD. (2003) Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 42:761-773.
100. Kang YJ, Zhou Z. (2005) Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. Mol Aspects Med. 26:391-404.

101. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaâ S. (2007) Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. Life Sci 80:1033-1039.

102. Kasprzak A, Seidel J, Adamek A, Biczysko W, Wysocki J, Spachacz R, Juszczyk J, Zabel M. (2006) Interleukin-2 (IL-2) expression in livers of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. Folia Histochem Cytobiol.44:103-010.

103. Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W, Wysocki J, Adamek A, Spachacz R, Surdyk-Zasada J. (2004) Expression of cytokines (TNF-alpha, IL-1alpha, and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. J Histochem Cytochem. 52:29-38.

104. Kathy S. Wang, David A. Frank, and Jerome Ritz.(2000) Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. Blood. 95:3183-3190 .Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. (1999) Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. Am J Obstet Gynecol, 181: 1530-1536.

105. Keiver K, Duggal S, Simpson ME. (2005) Ethanol administration results in a prolonged decreses in blood ionized calcium levels in the rat. Alcohol 37: 173-178.

106. Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. (2003) Liver fibrosis and inflammation. A review. Ann Hepatol. 2:159-163.

107. Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. (1991) Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. Hepatology. 13:267-276

108. Kitzberger R, Madl C, Ferenci P. (2005) Wilson disease. Metab Brain Dis. 20:295-302.

109. Kline AE, Bolinger BD, Kochanek PM, Carlos TM, Yan HQ, Jenkins LW, Marion DW, Dixon CE. (2002) Acute systemic administration of interleukin-10 suppresses the beneficial effect of moderate hypotermia following traumatic brain injury in rats. Brain Res 937:22-31.

110. Koningsberger JC, Van Asbeck BS, Van Hattum J, Wiegman LJ, Van Berge Henegouwen GP, Marx JJ. (1993) The effect of porphyrins on cellular redox systems: a study on the dark effect of porphyrins on phagocytes. Eur J Clin Invest. 23:716-723.

111. Krueger M, Nauck MS, Sang S, Hentschel R, Wieland H, Berner R. (2001) Cord blood levels of interleukin-6 and interleukin-8 for the immediate diagnosis of early-onset infection in premature infants. Biol Neonate 80:118-123

112. Köhidai L, Csaba G (1998). "Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular Tetrahymena pyriformis". *Cytokine* **10** (7): 481–6.

113. Langer M, Modi BP, Agus M. (2006) Adrenal insufficiency in the critically ill neonate and child. Curr Opin Pediatr.18:448-453.

114. Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. (2001) The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). Planta 212:323-331.

115. Lieber CS. (1994) Susceptibility to alcohol-related liver injury. Alcohol Alcohol Suppl. 2: 315-326.

116. Locatelli F, Andrulli S, Memoli B, Maffei C, Del Vecchio L, Aterini S, De Simone W, Mandalari A, Brunori G, Amato M, Cianciaruso B, Zoccali C. (2006) Nutritional-inflammation status and resistance to erythropoietin therapy in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 21:991-998

117. Lopes AA, Elder SJ, Ginsberg N, Andreucci VE, Cruz JM, Fukuhara S, Mapes DL, Saito A, Pisoni RL, Saran R, Port FK. (2007) Lack of appetite in haemodialysis patients associations with patient characteristics, indicators of nutritional status and outcomes in the international DOPPS. Nephrol Dial Transplant 22:3538-3546

118. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. (2002) Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. Pediatr Res. 52: 373-376.

119. Luheshi GN. (1998) Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. Ann N Y Acad Sci. 856: 83-89.

120. Maile P. (1999) Oral chelation and nutritional replacement therapy for chemical and heavy metal toxicity and cardiovascular disease. Townsend Letter.

121. Mandrekar P, Szabo G. (2009) Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. J Hepatol. 50:1258-1266.

122. Marik PE. (2007) Mechanisms and clinical consequences of critical illness associated adrenal insufficiency.Curr Opin Crit Care 13:363-369.

123. Matsui T, Ishikawa T, Takeuchi H, Okabayashi K, Maekawa T. (2004) Mild hypotermia inhibits IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells. Acta Anaesthesiol Scand 48:205-210.

124. Matsui T, Ishikawa T, Takeuchi H, Okabayashi K, Maekawa T. (2006) Mild hypotermia promotes proinflammatory cytokine production in monocytes. J Neurosurg Anesthesiol 18:32-36.

125. Matsui T, Kakeda T. (2008) IL-10 production is reduced by hypotermia but augmented by hypertermia in rat microglia. J Neurotrauma 25:709-715.

126. May Z, Taba G., Blázovics A., Székely E., Bíró E., Fébel H., Szentmihályi K. (2005) Stripping technika alkalmazása különböző mintákban lévő szelén meghatározásánál voltammetriás módszerrel. XI. Nemzetközi Vegyészkonferencia Proceeding: 354-356, ISBN 973-7840-07-0

127. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. (2004) Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. Br J Cancer. 90:2312-2316.

128. Mishra UK, Jacobs SE, Doyle LW, Garland SM. (2006) Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. Arch Dis Child 91:F208-F212

129. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. (2003) The dual role of IL-10. Trends Immunol. 24:36-43.

130. Molnár MZ, Czira M, Ambrus C, Szeifert L, Szentkirályi A, Bekő G, Rosivall L, Remport Á, Novák M, Mucsi I. (2007) Anemia is associated with mortality in kidney-transplanted patients-a prospective cohort study. Am J Transplant. 818-24

131. Molnar MZ, Remport A, Czira ME, Sarvary E, Beko G, Rudas A, Ujszaszi A, Novak M, Mucsi I. (2009) The role of the malnutrition-inflammation complex syndrome in post-transplant anemia: results of the malnutrition-inflammation complex syndrome in transplantation-Hungary (minit-hu) study 14th ESOT Congress, Paris.

132. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19: 683–765.

133. Mudipalli A. (2007) Lead hepatotoxicity and potential health effects. Indian J Med Res. 126:518-527.

134. Müller C. (2006) Liver, alcohol and gender. Wien Med Wochenschr. 156:523-526.

135. Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. (1999) Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. Hepatology. 30:934-943.

136. Nelms K, Huang H, Ryan J, Keegan A, Paul WE. (1998) Interleukin-4 receptor signalling mechanisms and their biological significance.Adv Exp Med Biol. 452:37-43.

137. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. (1999) The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol.17:701-738.

138. Ng PC, Lee CH, Lam CW, Ma KC, Chan IH, Wong E, Fok TF. (2004) Transient adrenocortical insufficiency of prematurity and systemic hypotension in very low birthweight infants. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 89:F119-126.

139. Ng PC. (2008) Is there a "normal" range of serum cortisol concentration for preterm infants? Pediatrics. 122:873-875

140. Nieboer P, van der Werf TS, Beentjes JA, Tulleken JE, Zijlstra JG, Ligtenberg JJ. (2000) Catecholamine dependency in a polytrauma patient: relative adrenal insufficiency? Intensive Care Med 26: 125-127

141. Nishio A, Keeffe EB, Gershwin ME. (2002) Immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis. Semin Liver Dis. 22:291-302.

142. Nyirády P, Blázovics A, Romics I May Zoltán, Székely E, Bekő G, Szentmihályi K. (2009) Microelement concentration differences between patients with and without prostate adenocarcinoma. Trace Elements in the Food Chain Vol. 3. Deficiency or excess of trace elements in the environment as a risk of health, Eds. Szilágyi M. and Szentmihályi K. Hungarian Academy of Sciences, pp. 26-30. Budapest,.

143. Okazaki K, Nishida A, Kato M, Kozawa K, Uga N, Kimura H (2006) Elevation of cytokine concentrations in asphyxiated neonates. Biol Neonate 89:183-189.

144. Old LJ (1995). Tumor necrosis factor (TNF). Science 230 (4726): 630–2.

145. Opal SM, DePalo VA. (2000) Anti-inflammatory cytokines. Chest. 117:1162-1172.

146. Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine, Jpn. J. Nutr, 44:307-315.

147. Pár G, Berki T, Pálinkás L, Balogh P, Szereday L, Halász M, Szekeres-Barthó J, Miseta A, Hegedus G, Mózsik G, Hunyady B, Pár A. (2006) [Immunology of HCV infection: the causes of impaired cellular immune response and the effect of antiviral treatment] Orv Hetil. 147:591-600.

148. Park IK, Paik WK. (1990) The occurrence and analysis of methylated amino acids in protein methylation. 1-16 Eds., Paik WK, and Kim S. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida,

149. Perry HM 3rd, Horowitz M, Fleming S, Kaiser FE, Patrick P, Morley JE, Cushman W, Bingham S, Perry HM (1998) Effect of recent alcohol intake on parathyroid hormone and mineral metabolism in men, Alcohol Clin Exp Res 22:1369–1375.

150. Perry VH. (2004) The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. Brain Behav Immun. 18:407–413.

151. Pinzani M, Marra F. (2001) Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. Semin Liver Dis. 21:397-416.

152. Poikolainen K, Alho H. (2008) Magnesium treatment in alcoholics: a randomized clinical trial. Subst Abuse Treat Prev Policy 25:3-5.

153. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF Jr, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS (2007) Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. Circulation 116:1234-1241.

154. Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Giannaki G, Rizos D, Phocas I, Sarandakou A. (1999) Patterns of inflammatory cytokine serum concentrations during the perinatal period. Early Hum Dev 56:31-38.

155. Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Klosterhalfen B, Sigler M, Schumacher K,Duchateau J, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. (2001) Influence of temperature during cardiopulmonary bypass on leukocyte activation, cytokine balance, and post-operative organ damage. Shock.15:372-377

156. Qing M, Wöltje M, Schumacher K, Sokalska M, Vazquez-Jimenez JF, Minkenberg R, Seghaye MC. (2006) The use of moderate hypotermia during cardiac surgery is associated with repression of tumour necrosis factor-alpha via inhibition of activating protein-1: an experimental study. Crit Care 10:R57.

157. Rambod M, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K (2008) Malnutrition-Inflammation Score for risk stratification of patients with CKD: is it the promised gold standard? Nat Clin Pract Nephrol 4:354-355.

158. Remport A, Czira M E, Rudas A., Ujszaszi A, Sarvary E, Beko G, Mucsi I, Novak M, Molnar MZ. (2009) Association between the malnutrition and inflammation complex syndrome score and mortality in kidney transplanted 14th ESOT Congress, Paris

159. Rivero-Pérez MD, Muñiz P, Gonzalez-Sanjosé ML.(2007) Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. J Agric Food Chem. 55:5476-83.

160. Rizos D, Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Trakakis E, Salamalekis E. (2007) Cytokine concentrations during the first days of life. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 131:32-35.

161. Rojo LE, Fernández JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB. (2008) Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. Arch Med Res. 39:1-16.

162. Róka A, Vásárhelyi B, Bodrogi E, Machay T, Szabó M. (2008) Elevated morphine concentrations in neonates treated with morphine and prolonged hypothermia for hypoxic ischaemic encephalopathy. Pediatrics 121:e844-849

163. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, Vento G, Antinori A, Tortorolo G.(2001) Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. Eur J Pediatr 160:345-350.

164. Rossi L, Lombardo MF, Ciriolo MR, Rotilio G. (2004) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. Neurochem Res. 29:493-504.

165. Russwurm S, Stonāns I, Schwerter K, Stonāne E, Meissner W, Reinhart K. (2002) Direct influence of mild hypotermia on cytokine expression and release in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. J Interferon Cytokine Res 22:215 221.

166. Saliba E, Henrot A. (2001) Inflammatory mediators and neonatal brain damage. Biol Neonate 79:224-227.

167. Sarandakou A, Giannaki G, Malamitsi-Puchner A, Rizos D, Hourdaki E, Protonotariou E, Phocas I. (1998) Inflammatory cytokines in newborn infants. Mediators Inflamm. 7:309 – 312

168. Scher M Perinatal asphyxia: timing and mechanisms of injury in neonatal encephalopathy. (2001) Curr Neurol Neurosci Rep 1:175-84.

169. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol. 75:163-189.

170. Scumpia PO, Sarcia PJ, Kelly KM, DeMarco VG, Skimming JW. (2004) Hypothermia induces anti-inflammatory cytokines and inhibits nitric oxide and myeloperoxidase-mediated damage in the hearts of endotoxemic rats. Chest. 125:1483-1491.

171. Shaftel SS, Griffin WS, O'Banion MK. (2008) The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective.J Neuroinflammation.;5:7.

172. Shalan MG, Mostafa MS, Hassouna MM, El-Nabi SE, El-Refaie A. (2005) Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements.Toxicology 206:1-15.

173. Shenker Y, Skatrud JB. (2001) Adrenal insufficiency in critically ill patients Am J Respir Crit Care Med 163:1520-23

174. Snow WM, Murray R, Ekuma O, Tyas SL, Barnes GE. (2009) Alcohol use and cardiovascular health outcomes: a comparison across age and gender in the Winnipeg Health and Drinking Survey Cohort. Age Ageing 38:206-12.

175. Stanley LL, Mazier MJ. (1999) Potential explanations for the French paradox. Nutr Res 19:3–15.

176. Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. (2000) Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). Nephrol Dial Transplant 15:953-960.

177. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T. (1999) Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. Kidney Int 55:1899-1911.

178. Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G. (2001) Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. Brain Res Bull. 55:175-185.

179. Szabó M, Treszl A, Roka A, Vásárhelyi B, Mészáros G, Tulassay T.(2008) Cytokine balance is shifted to a pro-inflammatory status in postasphyxic neonates treated with systemic hypothermia when cortisol levels are lower than the median. Acta Pediatrica**:** pp. 28-29.

180. Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein FS. (1995) Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. Stroke 26:1093-1100.

181. Szende B, Tyihák E, Trézl L. (2001) Role of arginine and its methylated derivatives in cancer biology and treatment. Cancer Cell Int 1:1-3.

182. Szentmihályi K, Fehér E, Vinkler P, Kéry A, Blázovics A.(2004) Metabolic alterations of toxic and nonessential elements by the treatment of Sempervivum tectorum extract in a hyperlipidemic rat model. Toxicologic Pathology 32:50-57.

183. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. (2009) Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. Clin Rev Allergy Immunol. 36:4-12.

184. Thurman RG. (2000) Sex-related liver injury due to alcohol involves activation of Kupffer cells by endotoxin. Can J Gastroenterol. 14:129D-135D.

185. Tiegs G (2007) Cellular and cytokine-mediated mechanisms of inflammation and its modulation in immune-mediated liver injury. Z Gastroenterol. 45:63-70.

186. Tocci MJ. (1997) Structure and function of interleukin-1 beta converting enzyme. Vitam Horm. 53:27-63.

187. Thornton AM, Shevach EM (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production". *J. Exp. Med.* 188: 287–96

188. Treszl A, Héninger E, Kálmán A, Schuler A, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2003) Lower prevalence of IL-4 receptor alpha-chain gene G variant in very-low-birth-weight infants with necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 38:1374-8.

189. Treszl A, Kocsis I, Szathmári M, Schuler A, Héninger E, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2003) Genetic variants of TNF-alpha, IL-1beta, IL-4 receptor alpha-chain, IL-6 and IL-10 genes are not risk factors for sepsis in low-birth-weight infants. Biol Neonate. 83:241-5.

190. Treszl A, Tóth-Heyn P, Kocsis I, Nobilis A, Schuler A, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2002) Interleukin genetic variants and the risk of renal failure in infants with infection. Pediatr Nephrol. 17:713-7

191. Treszl A, Tulassay T, Vasarhelyi B. (2006) Genetic basis for necrotizing enterocolitis--risk factors and their relations to genetic polymorphisms. Front Biosci. 11:570-580

192. Treszl A, Vásárhelyi B, Tulassay Zs, Szathmári M (2000) A tumor nekrózis faktor-alfa élettana és szerepe egyes betegségek patogenezisében Magyar Belorvosi Archívum 53: 397-403.

193. Treszl A. (2005) Citokin gén-polimorfizmusok jelentősége a kissúlyú koraszülötteket érintő perinatális szövődmények kialakulásában, Ph.D. disszertáció, Budapest, Semmelweis Egyetem

194. Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. (1999) Alcohol Clin Exp Res. 23:911-6.

195. Tyihák E, Trézl L, Szende B. (1998) Formaldehyde cycle and the phases of stress syndrome. In: Stress of Life: From molecules to Man. Ann NY Acad Sci 851: 259.

196. Tyihák E, Takátsy A, Móricz Á. M, Ott P. G, Ohmacht R. (2009) Trace elements as formaldehyde carriers. Trace Elements in the Food Chain Vol. 3. Deficiency or excess of trace elements in the environment as a risk of health, Eds. Szilágyi M. and Szentmihályi K. Hungarian Academy of Sciences, pp. 392-396. Budapest,

197. Upadhyay G, Singh AK, Kumar A, Prakash O, Singh MP. (2008) Resveratrol modulates pyrogallol-induced changes in hepatic toxicity markers, xenobiotic metabolizing enzymes and oxidative stress. Eur J Pharmacol 596:146-52.

198. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G. (1998) Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. J. Exp. Med. 188: 1751–1756.

199. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ. 10 (1): 45–65.

200. Walsh TJ, Tilson HA (1984) Neurobehavioral toxicology of the organoleads. Neurotoxicology. 5:67-86.

201. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Chan IH, Gao P, Lui SF, Li PK, Sanderson JE. (2005) Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. Nephrol Dial Transplant 20:1676-85.

202. Wang S, Fan Y, Han X, Yang J, Bilenki L, Yang X. (2001) IL-12-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression contributes to airway eosinophilic inflammation in a mouse model of asthma-like reaction. J Immunol. 166:2741-9.

203. Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A. (1998) IL-4-induced apoptosis in peripheral blood eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 102:1013-1020.

204. Wei H, Zhang R, Wang C, Zheng H, Li A, Chou KC, Wei DQ. (2007) Molecular insights of SAH enzyme catalysis and implication for inhibitor design. J Theor Biol ;244:692-702.

205. Wiggelinkhuizen M, Tilanus ME, Bollen CW, Houwen RH. (2009) Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. Aliment Pharmacol Ther. 29:947-58.

206. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A (1998) Endothelial cell "memory" of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies J. Exp. Med. 188: 1757–1762

207. Xanthou M, Fotopoulos S, Mouchtouri A, Lipsou N, Zika I, Sarafidou J. (2002) Inflammatory mediators in perinatal asphyxia and infection. Acta Paediatr Suppl 91:92-97.

208. Yamashina S, Takei Y, Ikejima K, Enomoto N, Kitamura T, Sato N. (2005) Ethanol-induced sensitization to endotoxin in Kupffer cells is dependent upon oxidative stress. Alcohol Clin Exp Res. 29:246S-250S.

209. Zhu ML, Kyprianou N. (2008) Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer. 15:841-849.

210. Zidenberg-Cherr S, Keen CL. (1991) Essential trace elements in antioxidant processes. In Dreosti E.I: Trace elements, micronutrients, and free radicals. Totowa, New Jersey: Humana Press; 107-128.

A dolgozathoz kapcsolódó közlemények

Folyóiratcikkek

1. **Bekő G**, Hagymási K, Szentmihályi K, Bányai ES, Osztovits J, Fodor J, Fehér J, Blázovics A. (2009) Sex-dependent alterations in erythrocyte trace element levels and antioxidant status after a month of moderate daily red wine consumption. Eur J Gastroenterol Hepatol. Sep 25. [Epub ahead of print], IF: 2,08
2. **Bekő G**, Treszl A, Róka A, Vásárhelyi B, Mészáros G, Tulassay T, Azzopardi D, Szabó M.(2009) Changes In Serum Cytokine Levels In Normothermic And Hypothermic Infants After Perinatal Asphyxia Pediatric Research (revízió alatt) IF:
3. **Bekő G**. (2008) Biochip technika a labordiagnosztikában, citokinmérések. Orvosképzés; 4: 309-312
4. **Bekő G**, Krkos K, Rácz K Patócs A, Tulassay Zs. (2008) A szérum inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) referenciatartományának vizsgálata. Magyar Belorvosi Archivum 5: 400-405.
5. Gyarmati B, **Bekő G**, Szalay B, Cseh A, Vásárhelyi B, Treszl A: Maternal cytokine balance on 3rd postpartum day is not affected by the mode of delivery after healthy pregnancies. The Journal of International Medical Research (elfogadva 2009 szeptember) IF: 0,821
6. Molnár MZ, Czira M, Ambrus C, Szeifert L, Szentkirályi A, **Bekő G**, Rosivall L, Remport Á, Novák M, Mucsi I. Anemia is associated with mortality in kidney-transplanted patients-a prospective cohort study. Am J Transplant. 2007 818-24, IF: 6,559
7. **Bekő G**, Treszl A, Róka A, Vásárhelyi B, Mészáros G, Tulassay T, Azzopardi D, Szabó M.(2009) Changes In Serum Cytokine Levels In Normothermic And Hypothermic Infants After Perinatal Asphyxia Pediatric Research (revízió alatt) IF:
8. Molnáar M. Z, Keszei A, Czira M. E, Rudas A, Újszászi A; Háromszeki B, Kósa J. P, Lakatos P, Sárváry E, **Bekő G**, Fornádi K, Kiss I, Remport Á, Novák M, Kövesdy Cs. P, Kalantar-Zadeh K, Mucsi I. Validation of the Malnutrition-Inflammation Score in a large cohort of kidney transplantrecipients. American Journal of Kidney Disease 2009 (revízió alatt) IF:

Lektorált könyvben megjelent cikkek:

1. **Bekő G**, Ostovits J, Visnyei Zs, Szalay F, Sátori A, Blázovics A, Szentmihályi K. (2009) Significant difference in the concentration of Special metal elements in Wilson's disease with different symptoms during penicillamine treatment Trace elements in the food chain 3: 31-35. ISBN 978-963-7067-19-8
2. Nyirády P, Blázovics A, Romics I, May Z, Székely E, **Bekő G**, Szentmihályi K. Microelement concentration differences between patients with and without prostate adenocarcinoma Trace elements in the food chain 2009;3 :26-30. ISBN 978-963-7067-19-8

Idézhető absztraktok és előadások

1. **Bekő G**, Osztovits J, Visnyei Z., Szalay F., Sátory A,. Blázovics A, Szentmihályi K. Significance of measurement and difference of special metal elemens in Wilson's disease during penicillinamin treatment. Clin Chem Lab Med 2009;47 Special Supplement PP s1-s409
2. **Bekő G**, Hagymási K, Szentmihályi K Biró E, Osztovits J, Szalay F, Bárkovits S, Blazovics A. (2008) How can nutritional factors modify the cytokine pattern and redox parameters in alcoholic drink consumption women? Clin Chem Lab Med, 46, S351
3. **Bekő G**., Bíró E., Kovács M., Mátrai B. Újabb citokin mérési módszerek a labordiagnosztikában A citokin és növekedési faktor panelek értéke Klin. Kísérl. Lab. Med. 2008 34: 41.
4. Novák M., Fehér A., Nobilis A., Olajos F., **Bekő G**. Újszülöttek és koraszülöttek prokalcitonin és C-reaktív protein szintjének követése az élet korai szakaszában Klin. Kísérl. Lab. Med. 2008 34: 67.
5. **Bekő G**, Osztovics J, Visnyei Z, Csák T, Blázovics A, Kovács M, Szalay F. (2008) Different cytokine patterns in alcoholic cirrhosis, MCV-related cirrhosis and primary biliary cirrhosis. Z. Gastroenterol. 46; 488.
6. **Bekő G**., Osztovits J., Visnyei Zs., Csák T., Blázovics A., Sátori A., Szalay F. (2008) Biochip citokin- és növekedési faktor protein array vizsgálatok különböző etiológiájú májcirrhosisban Magyar Belorvosi Archivum suppl 3; pp 45.
7. **Bekő G**., Bíró E., Kovács M., Mátrai B. (2008) Újabb citokin mérési módszerek a labordiagnosztikában A citokin és növekedési faktor panelek értéke Klin. Kísérl. Lab. Med. 34: 41.
8. B**ekő G**., Osztovics J., Visnyei Z., Csák T., Blázovics A., Kovács M., Szalay F. (2008) Different cytokine patterns in alcoholic cirrhosis, MCV-related cirrhosis and primary

biliary cirrhosis. 50th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology Tihany, June 6-11. Z. Gastroenterol. 46, 487-522, pp. 488. .

9. **Bekő G**, Csák T, Hagymási K,Osztovits J, Visnyei Zs, Bányai É, Blázovics A. (2007) The change in the levels of cytokines and growth factors in healthy young adults after regular red wine consumption. Z Gastroenterol 44: 421-452.
10. **Bekő G**, Bíró E, Nyirády P, Horváth A, Romics I, Kovács M, Blázovics A. (2007) Levels of cytokines and growth factors in early prostate cancer Clin Chem Lab Med 45: pp 345.
11. **Bekő G**, Keserű K.(2006) Biochip módszerrel meghatározott cytokin és növekedési faktorok jelentősége májbetegségekben Klin. Kísérl. Lab. Med. 32: 40.
12. Szabó M, **Bekő G**, Treszl A, Roka A, Vásárhelyi B, Mészáros G, Tulassay T.(2008) Cytokine balance is shifted to a pro-inflammatory status in postasphyxic neonates treated with systemic hypothermia when cortisol levels are lower than the median. Acta Pediatrica**:** pp. 28-29.
13. Molnar M.Z, Remport A, Czira M. E, Sarvary E, **Beko G**, Rudas A, Ujszaszi A, Novak M, Mucsi I. (2009) The role of the malnutrition-inflammation complex syndrome in post-transplant anemia: results of the malnutrition-inflammation complex syndrome in transplantation-Hungary (minit-hu) study 14th ESOT Congress 2009
14. Blázovics A, Kovács Á, **Bekő G,** Sátori A, Szilvás Á. The weakest correlation between redox parameters in colon cancer, 18th IFCC - FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine National Congress of the Austrian Society of Laboratory Medicine and Clinical Chemistry, 7 - 11 June 2009 – Innsbruck Clin Chem Lab Med 2009;47 Special Supplement PP s1-s409
15. Blázovics A, Fébel H, Székely E, **Bekő G**, Szóke E, Szentmihályi K, Sárdi É. (2008) Effect of high resveratrol content red wine versus ethanol on homeostasis in rats. Z. Gastroenterol. 46, 487-522, pp. 489
16. Remport Á, Czira M. E, Rudas A, Ujszászi A, Sárváry E, **Bekő G**, Mucsi I, Novák M, Molnár M Z. Assotiation between the malnutrition and inflammation complex syndrome score and mortality in kidney transplanted (14th ESOT Congress 2009)
17. Fehér A, Olajos F, Nobilis A, Novák M, **Bekő G** (2009) Monitoring of procalcitonin and C-reactive protein level of prematures and newborns in the early stage of their lives. Clin Chem Lab Med 47: S223
18. **Bekő G,** Blázovics A, Szentmihályi K, Biró E, Sátori A , Romics I, Nyirády P. Daily table beet consumption modifies the levels of cytokines and growth factors in metastatic prostate

cancer. XVIII. International Semmelweis Symposium of Urology 2009 , Uro Onkológia 2009; 4, pp. 22

19. **Bekő G,** Blázovics A, Szentmihályi K, Bíró E, Romics I, Nyirády P. Biochip cytokine pattern in early prosate cancer. XVIII. International Semmelweis Symposium of Urology 2009 , Uro Onkológia 2009; 4, pp. 23
20. Blázovics, Hagymási K, Blazics B, Balázs A, **Bekő G**. Jelentkezik-e szex-függő eltérés az immunreakciókban kismértékű tartós vörösborfogyasztás alkalmával? XIV. .Congressus Pharmaceuticus Hungaricus 2009 , Gyógyszerészet 2009; 11, pp 17: S79
21. Blázovics A, Fébel H, Blazics B, Balázs A, **Bekő G**, Sárdi É, Szentmihályi K. Ambivalens eredmények a vörösbor hatásával kapcsolatban patkányokban. XIV. .Congressus Pharmaceuticus Hungaricus 2009 , Gyógyszerészet 2009; 11, pp 187 : S80

Egyéb előadások

1. **Bekő G**, Blázovics A., Osztovits J és mtsai: A redox-homeosztázist befolyásoló fémioneltérések a D-penicillaminnal kezelt Wilson-kóros betegekben. *MSZKT Munkaértekezlet* Budapest, 2008. szept. 26.
2. **Bekő G**, Hagymási K, Székely E és mtsai: Hogyan befolyásolja a kismértékű tartós vörösborfogyasztás az egészséges fiatalok immunprofilját? *KÉKI 330, Tudományos Kollokvium,* 2008. 03. 07.
3. **Bekő G,** Visnyei Zs, Osztovits J, Csák T, Szalay F, Czabai G. Bárkovits S., Blázovics A. Penicillamin-kezelt Wilson-kóros betegek redox-státusa. MSZKT konferencia, Pécs, 2007. október 11-13
4. **Bekő G.,** Szentmihályi K., Hagymási K., Stefanovits-Bányai É., Fodor J., Balázs A., Szalay F., Blázovics A.: Gender-dependent alteration of metal element homeostasis after one-month of red wine consumption. Mikroelemek tápanyagkörforgalma és újrahasznosítása konferencia, Mosonmagyaróvár 2008.
5. **Bekő G.,** Hagymási K., Székely E., Szalay F., Stfanovits-Bányai É., Pintér E., Bárkovits S., Blázovics A.: Hogyan befolyásolja a kismértékű és tartós vörösborfogyasztás az egészséges fiatalok immunprofilját? Táplálkozási Fórum, Budapest, 2007.

Disszertációtól független közlemények

Folyóiratcikkek:

1. **Bekő G**, Varga I, Gláz E, Sereg M, Feldman K, Tóth M, Racz K, Patocs A. (2009), Cut-off values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods Clinica Chimica Acta (elfogadva 2009 nov. 30), IF: 2,96 (2008)
2. Osztovits J, Horváth T, Abonyi M, Tóth T, Visnyei Z, **Bekö G**, Csák T, Lakatos PL, Littvay L, Fehér J, Kempler P, Kollai M, Szalay F.(2009) Chronic hepatitis C virus infection associated with autonomic dysfunction. Liver Int. Nov;29(10):1473-8. IF: 2,908
3. Mondok A, Varga I, Gláz E, Szűcs N, Tóth M, Patócs A, **Bekő G**, Rácz K: 11ß-hydroxysteroid dehydrogenase activity in acromegalic patients with normal or impaired carbohydrate metabolism Steroids 2009 Sep;74(9):725-9. IF: 2,588 (2008), IF: 2,588
4. Mondok A, Tóth M, Patócs A, Szücs N, Igaz P, Pusztai P, Czirják S, **Bekő G**, Gláz E, Rácz K, Tulassay Z.(2009) Outcome of somatostatin analogue treatment in acromegaly Orv Hetil 150(31):1457-146262.
5. Lendvai N, Szabó I, **Bekő G**, Horányi J, Tarjányi M, Alföldi S, Szabó I, Rácz K, Patócs A. (2009) SDHD Génmutációhoz társult extraadrenális phaeochromocytoma. Orv Hetil 150(14):645-649.
6. Molnár MZ, Czira M, Ambrus C, Szeifert L, Szentkirályi A, **Bekő G**, Rosivall L, Remport Á, Novák M, Mucsi I. Anemia is associated with mortality in kidney-transplanted patients-a prospective cohort study. Am J Transplant. 2007 818-24, IF: 6,423

Lektorált könyvben megjelent cikkek:

1. Blázovics Anna, Szilvás Ágnes, Sárdi Éva, Székely Edit, Bekő Gabriella, Szentmihályi Klára.(2009) Metal homeostasis in colorectal cancer patients after colectomy Trace elements in the food chain 3; 41-45. (ISBN 978-963-7067-19-8.)
2. Várkonyi J, **Bekő G**, Kollai G, Karády I.(2009) The iron-copper relation in myelodysplastic syndromes. Trace elements in the food chain 3; 407-411. (ISBN 978-963-7067-19-8.)

Idézhető absztraktok és előadások

1. Szentmihályi K, **Bekő G**, Székely E., May Z, Blázovics A.(2009)Selenium determination in blood samples of patients with pct and Wilson's disease by cathodic stripping voltammetry. Clin Chem Lab Med 2009;47 Special Supplement PP s1-s409 pp.
2. Cseprekál O, Kis É, **Bekő G**, Sallay P, Szabó A, Tivadar T, Szabó A, Reusz Gy Arterial stiffness and disturbed CA-P and bone metabolism after kidney transplantation. 5th Congress of the International Pediatric Transplant Association 2009 Istanbul
3. Patócs A, **Bekő G**, Varga I, Butz H, Glaz E, Tóth M, Racz K: Cut-off values of midnight salivary cortisol for diagnosis of overt hypercortisolism is highly influenced by assay methods (ENDO9, Washington DC)
4. Patócs A., Lendvai N., Szabó Ildikó., **Bekő G.,** Horányi J., Alföldi S. Csírasejtes SDHD mutációhoz társult extraadrenális paraganglioma első hazai esete Klin. Kísérl. Lab. Med. 2008 34: 42.
5. Sátori A., Olajos F., **Bekő G**. A D3-vitamin életkor és évszak függő változásai Klin. Kísérl. Lab. Med.2008 34: 64.
6. Kocsis I., Molnár-Világos Gy., Dank M., Bekő G. Cystatin-C szerepe a vesefunkció monitorozásában, bifoszfonát adjuváns kezelésben részesülő daganatos betegek esetében Kísérl. Lab. Med. 2008 34:
7. Mihály Z., Hegedűs V., Gerő D., **Bekő G**., Lotz G., Szentmihályi K., Monostory K., Szijártó A., Blázovics A.: Bioactive agents against systemic low grade inflammation. 50th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology Tihany, June 6-11. Z. Gastroenterol. 46, 487-522, pp. 503, 2008
8. Blázovics A., Szilvás Á., Székely Gy., Székely E., **Bekő G**., Barkovits S., Sárdi É.: Measuring of redox homeostasis, bounded HCHO and protoporphyrine concentrations of erythrocytes help us to predict early metastasis. Clin. Chem., Lab., Med., 2008/46, Spec. Suppl. pp. S51-S858,
9. **Bekő G,** Molnár-Világos Gy. (2006) Testnedvek vizsgálata IQTM200 vizeletüledék vizsgáló autómatával Klin. Kísérl. Lab. Med. 2006 32: 41.
10. Bíró E., Tar I., **Bekő G**. Milyen változást hozott a HbA1c standardizáció a diabeteses betegek követésében Klin. Kísérl. Lab. Med. 2006 32: Suppl
11. Czira M.E., Molnár M. Zs., Szeifert L., Adorjáni G., Lindner A., Újszászi Á., **Bekő G.**, Remport Á., Sárváry E.,Kennedy S., Mucsi I., Novák M. A gyulladás és a depresszió kapcsolata vesetranszplantált betegekben (Pszichiátriai Kongresszus 2008)

Egyéb előadások

12. Hegedűs V., Mihály Z. Szijártó A. Gerő D. **Bekő G**. Lotz G. Monostory K., Szentmihályi K., Blázovics A.: Molekuláris biológiai változások kísérletes zsírmájban. MSZKT Munkaértekezlet 2008. szept. 26., Budapest, Fiatal előadó díj
13. Nyirády P., Horváth A., Blázovics A, Székely E, Szentmihályi K, Sárdi É, **Bekő G**, Romics I. Új biokémiai és analitiai módszerek bevezetése a prosztatarák korai felismerésében és elkülönítő kórismézésében MSZKT Munkaértekezlet 2008. szept. 26., Budapest
14. Blázovics A., Tordai E., Stefanovits-Bányai É., **Bekő G**., Bárkovits S., Pintér E., Czabai G., Sárdi É.: A kötött formaldehid koncentrációjának változása „short term" alimentáris eredetű zsírmájban és alkoholos májkárosodásban patkányban. MSZKT konferencia, Pécs, 2007. október 11-13.
15. **Bekő G.** Automatával végzett vérképelemzés, II. Hematológiai Továbbképző Konferencia 2008

Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Blázovics Annának, a MTA doktorának, aki létrehozta azt a szellemi alkotóműhelyt, ahol az elmúlt évek során levelező Ph.D. hallgatóként dolgozhattam. Ebben a környezetben lehetőségem volt elsajátítani a kutatásban nélkülözhetetlen problémaorientált látásmódot és kérdésfelvetést. Bekapcsolódhattam olyan korszerű műszerek és eszközök használatába, amelyek lehetővé tették az orvosi kutatások nemzetközi szintű művelését.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szalay Ferencnek, a MTA doktorának témavezetőmnek, aki az I.sz. Belgyógyászati Klinikán mindvégig támogatott és biztatott kutatásaimban. Bevont az Intézetben zajló hepatológiai kutatásokba, a betegekkel kapcsolatos klinikai problémák felvetésében és a laboratóriumi eredmények értékelésében mindvégig segített.

Munkámat Prof. Dr. emeritus Fehér János MTA doktora programvezetőm mindvégig támogatta, tanácsai, útmutatásai kimondhatatlanul sokat segített a kutatói léttel járó és kikerülhetetlenül bekövetkező nehezebb időszakokban.

A citokinszint mérések mellett több ízben került sor egyéb, a Központi Laboratóriumban nem elérhető módszerek alkalmazására. Igen gyümölcsöző együttműködést sikerült kialakítani Dr. Ph.D. Szentmihályi Klárával, a MTA Kémiai Kutatóközpont tudományos csoportvezetőjével, aki fémion-meghatározásokban nyújtott felbecsülhetetlen segítséget. Hálával tartozom a közös kutatásokért. Prof. Dr. Stefanovits-Bányai Évának, a Budapesti Corvinus Egyetem egyetemi tanárának. Dr. Sárdi Éva MTA doktorának, a Budapesti Corvinus Egyetem tudományos tanácsadójának nagyon köszönöm a metildonor meghatározást, Dr. Ph.D. Székely Editnek, az Állami Egészségügyi Központ Sürgősségi Laboratóriuma vezetőjének pedig a porfirin méréseket. A perinatális vizsgálatok során a statisztikai kérdésekben dr.Ph.D. Treszl András, a Semmelweis Egyetem I.sz. Gyermekklinika kutatócsoportjának tagja volt a segítségemre. A közlemények megírásával kapcsolatos technikai kérdésekben Dr. Vásárhelyi Barna MTA doktora, az I.sz. Gyermekklinika kutatólaboratóriumának a vezetője nagyon sokat segített.

Dr. Ph.D. Mucsi Istvánnak a SE I. sz. Belklinika és Magatartástudományi Intézet docensének is köszönöm az együttműködését és tanácsait.

A Randox-Ltd-től Kovács Margit nyújtott nélkülözhetetlen segítséget a biochipek beállításánál, a mérésénél, a Bio-Rad Hungary-Ltd-től pedig Mátrai Beátának és Dr. Ph.D. Csanádi Gyulának tartozom hálával.

Laboratóriumi munkámat jól dokumentált, megfelelően gyűjtött és feldolgozott minták nélkül nem tudtam volna végezni. Ehhez lelkes és elkötelezett klinikai partnerekre volt szükség.

Közülük is ki kell emelnem Dr. Ph.D. Szabó Miklós adjunktust az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinikáról, Dr. Ph.D. Nyirády Péter docenst, az Urológiai Klinikáról, Dr. Ph.D. Abonyi Margit docenst, Dr. Csák Timeát, Dr. Osztovits Jánost, Dr.Visnyei Zsoltot I.sz. Belgyógyászati Klinikáról, Dr. Hagymási Krisztinát a II. Belgyógyászati Klinikáról dr. Ph.D. Molnár Miklós Zsoltot (Transzplantációs Klinika és Fresenius Dialísis Központ) és Dr. Ph.D. Sárvári Enikőt Transzplantációs Klinikáról. Köszönet illeti mindnyájukat.

A kutatómunka mellett a mindennapok során a klinikai laboratóriumi diagnosztikai kérdésekkel is meg kellett küzdeni. Azt, hogy a két külön feladatot mégis sikerült együtt ellátni, a Központi Laboratóriumban dolgozó munkatársaimnak köszönhetem, akik közül Dr. Ph.D. Kocsis Ibolyát szeretném kiemelni. Dr. Ph.D. Patócs Attilának köszönöm, hogy az Izotóp Laboratóriumban minden gondot levett a vállamról és emellett még a publikációk elkészültében is segített. Bíró Edinának és Olajos Ferencnek is hálával tartozom a sok technikai segítségért. A laboratórium összes dolgozójának köszönöm, hogy mellettem álltak és bíztattak. Bárkovits Saroltának és Pintér Edinának, a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika asszisztenseinek is hálás vagyok az áldozatos közös munkákért.

A kutatások nem valósulhattak volna meg az ETT 354/2006 és ETT 012/2006 a Randox Ltd, a BioRad Ltd, Diagnosticum Zrt, Olympus Hungary Kft, Roche Magyarország Kft, Diagon Kft támogatása nélkül. A betegek számára a céklakészítményt a GPS Powder Kft. biztosította, amelyet ezúton is hálásan köszönünk.

Végül, de nem utolsósorban, meg kell említsem családom mindvégig kitartó támogatását és szeretetét. Nélkülük nem készülhetett volna el ez a munka.